

明 細 書

ヘパリン様オリゴ糖含有HGF産生促進薬剤

技術分野

- [0001] 本発明は、ヘパリン骨格を有する低分子オリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩を含有するHGF産生促進薬剤に関する。

背景技術

- [0002] 再生因子・治療因子としてHGF(肝細胞増殖因子)が注目を浴びている。HGFは肝実質細胞の増殖を指標として発見された蛋白質であるが、その後の研究により、HGFは肝実質細胞以外にも多くの上皮系細胞や一部の間葉系細胞にも増殖作用を示すことが明らかとなっている。また、HGFの示す活性は細胞増殖活性のみならず、細胞遊走促進、形態形成促進、細胞死抑制、血管新生作用等多様な活性を示すことも知られている(非特許文献1)。HGFはその薬理作用から肝硬変治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗ガン剤、ガン療法用副作用防止剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸損傷治療剤、脳神経障害治療剤、免疫抑制副作用防止剤、コラーゲン分解促進剤、軟骨障害治療剤、動脈疾患治療剤、肺線維症治療剤、肝臓疾患治療剤、血液凝固異常治療剤、血漿低蛋白治療剤、創傷治療剤、神経障害改善薬、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤等(特許文献1～14参照)としての開発が期待されている。
- [0003] HGFは主に間葉系の細胞によって産生されるが、その産生量は臓器の傷害に応じて上昇する。例えば、肝臓に傷害が起こると、肝臓の血管内皮細胞やクッパー細胞、伊東細胞等の肝非実質細胞でHGFの産生が高まる。一方、この時、無傷の肺、脾臓、腎臓等の他の臓器でもHGFの発現が上昇し、血中のHGFレベルが上昇する。このことは、臓器の傷害に応じてHGFの発現を誘導する因子が血中に存在することを示すが、そのような因子はインジュリンと総称される(非特許文献2)。

インジュリンは単一の物質ではなく、例えばインターロイキン-1、FGF(線維芽細胞増殖因子)、PDGF(血小板由来増殖因子)等のサイトカインに加え、プロスタグランジン等のオートコイドがインジュリンとして同定されている。これらの因子は、HGF

のmRNAの発現を上昇させることにより、HGFの産生を高める。一方、インジュリンの探索過程でヘパリン及びヘパラン硫酸にもHGF産生促進活性があることが見出された(非特許文献3)。

ヘパリン及びヘパラン硫酸はHGFのmRNAの発現を上昇させずに、翻訳過程以後のステップに作用することが示唆されているが、詳細な機構は不明である。

[0004] ヘパリン及びヘパラン硫酸は、グリコサミノグリカン(GAG)として知られる一群の多糖類のメンバーである。ヘパリン及びヘパラン硫酸は、D-グルコサミンとウロン酸からなる二糖を基本単位とし、該二糖の繰り返しによって構成される多糖である(非特許文献4)。

ヘパリン及びヘパラン硫酸の分子量は不均一で、5000から30000程度のものが混在している。D-グルコサミン残基の6位の炭素は部分的にO-硫酸化を受けており、また、アミノ基は部分的にN-アセチル化もしくはN-硫酸化を受けている。ウロン酸残基としてはL-イズロン酸又はD-グルクロン酸の2種類をとりうるが、ヘパリンではほとんどがL-イズロン酸であり、ヘパラン硫酸ではほとんどがD-グルクロン酸である。ウロン酸残基の2位の炭素は部分的にO-硫酸化を受けている。さらに、その他の部位でも硫酸化が起こる場合があり、これらの硫酸化の位置の多様性が分子に多様性を与えている。ヘパリンの方がヘパラン硫酸よりも全体的に高度に硫酸化を受けている。しかしながら、組織から分離されるヘパリン又はヘパラン硫酸の調製物は不均一であり、両者の明確な区別は困難である。

[0005] ヘパリンは、従来より主に抗血液凝固剤として臨床の場で用いられている。例えば、ヘパリンは血液体外循環時の凝固防止や、播種性血管内凝固症候群(DIC)、心筋梗塞をはじめとする血栓性疾患の治療・予防等に用いられている。ヘパリンはそれ自体に抗血液凝固作用はないが、アンチトロンビンIII(ATIII)やヘパリンコファクター-IIと結合し、血液凝固因子である各種のセリンプロテアーゼを不活性化することで強力な血液凝固阻害作用を示す(非特許文献5)。

このように既に医薬品として使用されているヘパリンの新たな用途として、HGF産生促進薬としての利用が考えられる(特許文献15)。

ヘパリンをHGF産生促進薬として用いることができれば、前述のHGFの薬理作用

を介した各種疾患の治療効果を向上させることが期待できる。しかしながら、HGFの産生を促進する目的でヘパリンを用いる上では、従来から利用されてきたヘパリンの抗血液凝固作用は出血傾向につながり、副作用となることが考えられる。ヘパリンを人体に投与する際は、投与中の出血を防止するために、抗血液凝固作用をモニターしながら投与量を慎重にコントロールしなければならない。特に、未分画の高分子ヘパリンは抗血液凝固作用が強く、使用に当たっては細心の注意が必要である。このように、ヘパリンの抗血液凝固作用は、HGF産生促進薬として用いる際には欠点となる。

- [0006] また、ヘパリンは血管壁に存在するリポプロテインリパーゼ(LPL)を遊離させることによって血漿中のLPL活性を上昇させる作用も有している(非特許文献6)。

LPL活性の上昇は脂肪の分解によって血液清澄化を促すが、持続的なLPL活性の上昇は血中の遊離脂肪酸レベルを上昇させ、不整脈を引き起こす恐れがある。

そこで、抗血液凝固作用及びLPL放出活性は有しておらず、HGF産生促進作用のみを有するヘパリン又はヘパラン硫酸を調製する方法が切望された。

- [0007] ヘパリンの抗血液凝固作用を低下させる方法として、ヘパリンを低分子化することが知られている(非特許文献7)。前述のように、未分画の高分子ヘパリンは抗血液凝固作用が強く、使用に当たっては細心の注意が必要である。このような高分子ヘパリンの欠点を克服するものとして低分子ヘパリンが利用されている。前述のごとく、ヘパリンの抗血液凝固作用はヘパリン-ATIII複合体の形成によるものである。ヘパリン-ATIII複合体はトロンビン(血液凝固因子IIa)やその他の凝固因子(Xa、XIIa、XIa、IXa等)に結合してそれらを不活性化する。IIaの抑制には17糖以上のヘパリン構造が必要であり、高分子ヘパリンでは特にIIaとXaの不活性化が主な作用である。一方、ヘパリンを16糖以下のサイズに低分子化すると、17糖以上で見られるIIa阻害活性が抑制されるため、抗血液凝固活性が低下することが知られている(非特許文献8、9)。

また、低分子ヘパリンではLPL放出活性も低下することが知られている。(非特許文献10)。

- [0008] このように、ヘパリンを低分子化することで抗血液凝固作用とLPL放出活性を低下

させることが可能であるが、ここで、ヘパリンを低分子化させた場合に、HGF産生促進活性が保持されるかが問題となる。低分子ヘパリンとして知られるダルテパリンナトリウム(フラグミン静注;キッセイ薬品工業株式会社製)にはHGF産生促進活性があることが知られている(非特許文献11)。

しかし、ダルテパリンナトリウムは平均分子量では5000であるものの、分子量の分布幅は2000～9000と広く、このうちどの分子サイズがHGF産生促進活性を担っているのか不明である。特に、血液凝固因子IIaに対する阻害活性が低下する16糖以下の分子サイズ(分子量5000以下)にHGF産生促進活性が保持されているのかが重要であるが、この点は全く不明であった。

一方、ヘパリンを低分子化せずに抗血液凝固作用やLPL放出活性を低下させつつHGF産生促進活性を維持するような方法は全く知られていない。

特許文献1:特開平4-18028号公報

特許文献2:特開平4-49246号公報

特許文献3:ヨーロッパ公開第 492614号公報

特許文献4:特開平6-25010号公報

特許文献5:国際公開第3/8821号パンフレット

特許文献6:特開平6-172207号公報

特許文献7:特開平7-89869号公報

特許文献8:特開平6-40934号公報

特許文献9:国際公開第94/2165号パンフレット

特許文献10:特開平6-40935号公報

特許文献11:特開平6-56692号公報

特許文献12:特開平7-41429号公報

特許文献13:国際公開第93/3061号パンフレット

特許文献14:特開平5-213721号公報

特許文献15:特開平6-312941号公報

非特許文献1:マツモト・ケー(Matsumoto, K)他1名、キドニー・インターナショナル(Kidney Int.), 2001年、第59巻、p. 2023-2038

非特許文献2: マツモト・ケー (Matsumoto, K) ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステート・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.), 1992年、第89巻、p. 3800-3804

非特許文献3: マツモト・ケー (Matsumoto, K) ら、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 1993年、第114巻、p. 820-826

非特許文献4: スガハラ・ケー (Sugahara K) 他1名、アイ・ユー・ビー・エム・ビー・ライフ (IUBMB Life), 2002年、第54巻、p. 163-175

非特許文献5: ボーリン・エム・シー (Bourin, M. C) 他1名、ザ・バイオケミカル・ジャーナル (Biochem J.), 1993年、第289巻 (Pt2)、p. 313-330

非特許文献6: オリベクロナ・ティー (Olivecrona, T.) ら、ハーモステシス (Haemostasis), 1993年、23巻 (Suppl. 1)、p. 150-160

非特許文献7: リンハート・アール・ジェイ (Linhardt, R. J.) 他1名、セミナーズ・イン・トロンボシス・ヘモスタシス (Semin. Thromb. Hemost.), 1999年、第25巻、Suppl. 3、p. 5-16

非特許文献8: ホルマー・イー (Holmer, E.) ら、ハーモステシス (Haemostasis), 1986年、第16巻、suppl. 2、p. 1-7

非特許文献9: レイン・ディー・エー (Lane D. A.) ら、ザ・バイオケミカル・ジャーナル (Biochem. J.), 1984年、第218、巻、p. 725-732

非特許文献10: ナストロン・ビー (Nasstrom, B.) ら、ザ・ジャーナル・オブ・ラボラトリー・アンド・クリニカル・メディシン (J. Lab. Clin. Med.), 2003年、第142巻、p. 90-99

非特許文献11: (Matsumoto, K.) ら、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 1993年、第114巻、p. 820-826

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明の課題は、ヘパリン骨格を有し、ヘパリン又はヘパラン硫酸の抗血液凝固作用及びLPL放出活性を有さないか抑制されているオリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩を含むHGF産生促進薬剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは上記課題を解決すべくヘパリン及びヘパラン硫酸のHGF産生促進機能に関する研究を鋭意重ねた。その結果、ヘパリン又はヘパラン硫酸を低分子化したウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する2乃至16糖のオリゴ糖が、HGF産生促進作用を有することを見出した。また、前記オリゴ糖は、抗血液凝固作用及びリポプロテイン放出活性が低下していることを見出した。ヘパリン又はヘパラン硫酸を16糖以下に低分子化しても、HGF産生促進活性が保持されていることは従来全く知られていなかった。特に、ウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合してなる2糖化合物であってもHGF産生促進活性を有することは驚くべき発見であった。さらに本発明者らは、ヘパリン及びヘパラン硫酸においてグルコサミン残基の6位のヒドロキシル基又はグルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化されていることがHGF産生促進活性を発揮する効果を高めることを見出し、ヘパリン又はヘパラン硫酸を低分子化せずとも、グルコサミン残基の6位のヒドロキシル基のみが硫酸化されている構造、又はグルコサミン残基の2位のアミノ基のみが硫酸化されている構造に変換すればHGF産生促進作用を保持したまま、抗血液凝固作用及びリポプロテイン放出活性を低下させられることを見出した。かかる知見に基づき本発明者らはさらに研究をすすめ、本発明の完成に至った。

[0011] すなわち本発明は、

(1) ウロン酸残基(ウロン酸は、イズロン酸又はグルクロン酸を示す。以下、ウロン酸において同じ。)とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合もしくは β 1, 4-グリコシド結合してなる2糖、又はウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合もしくは β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する3乃至16糖のオリゴ糖又はその塩であって、

ウロン酸残基及びグルコサミン残基の少なくとも1つのヒドロキシル基が硫酸化、アルキル化、アシル化又はアミノ化されていてもよく、少なくとも1つのグルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化、アルキル化又はアシル化されていてもよいオリゴ糖又はその塩を有効成分として含有するHGF産生促進薬剤、

(2) 少なくとも1つのウロン酸残基の2位及び／又は少なくとも1つのグルコサミン残基の3位及び／又は6位のヒドロキシル基が硫酸化されていてもよいことを特徴とする上記(1)に記載のHGF産生促進薬剤。

(3) 少なくとも1つのグルコサミン残基において、6位のヒドロキシル基及び／又は2位のアミノ基が硫酸化されていることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載のHGF産生促進薬剤。

(4) 2乃至10糖からなるオリゴ糖であることを特徴とする上記(1)～(3)のいずれかに記載のHGF産生促進薬剤、

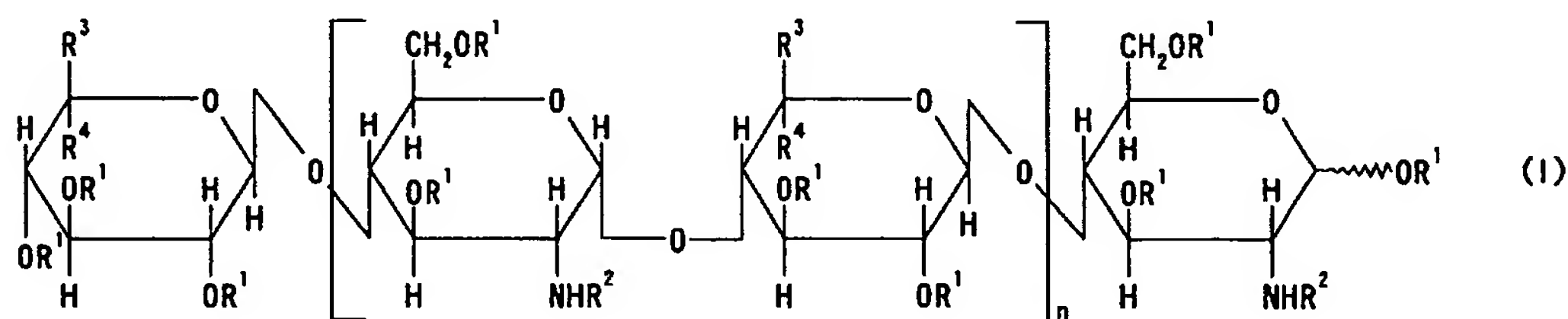
(5) オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸のヘパリナーゼ又はヘパリチナーゼ分解物であることを特徴とする上記(1)～(4)のいずれかに記載のHGF産生促進薬剤、

(6) オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸の亜硝酸分解法、過酸化水素分解法又は β 脱離のいずれかによる分解物であることを特徴とする上記(1)～(4)のいずれかに記載のHGF産生促進薬剤、

(7) オリゴ糖が、次の(a)～(h)で表される化合物のいずれかであることを特徴とする上記(1)に記載のHGF産生促進薬剤；

(a) 式(I)

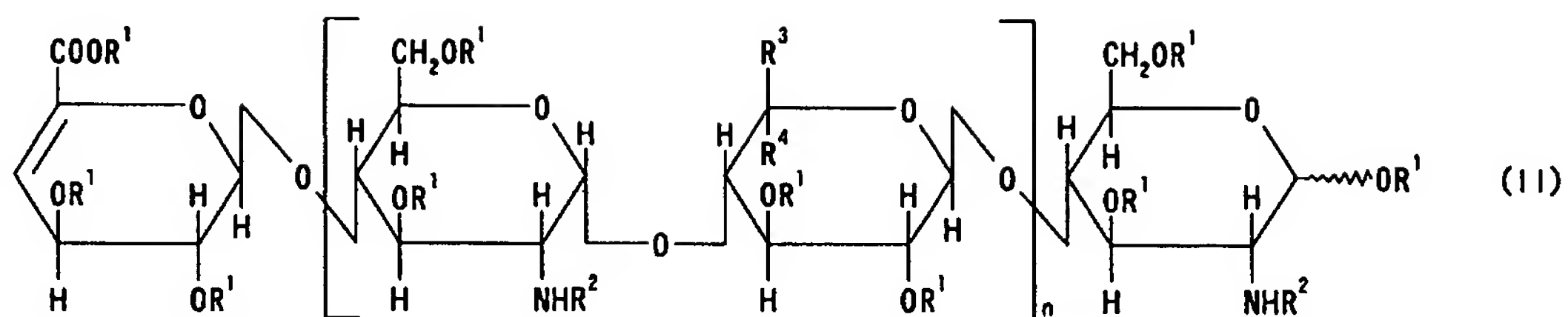
[化1]



(式中、 R^1 は、水素、硫酸基、アルキル基、アシル基又は置換基を有していてもよいアミノ基を示し、 R^2 は、水素、硫酸基、アルキル基又はアシル基を示し、 R^3 及び R^4 は異なって、水素又は置換基を有していてもよいカルボキシル基を示し、 n は0～7を示す。)

(b) 式(II)

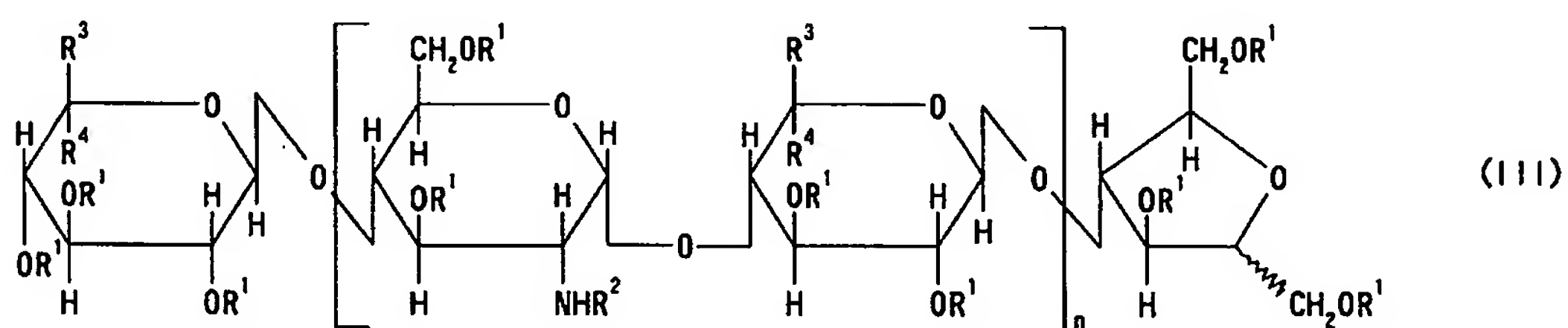
[化2]



(式中、各記号は上記と同じである。);

(c) 式(III)

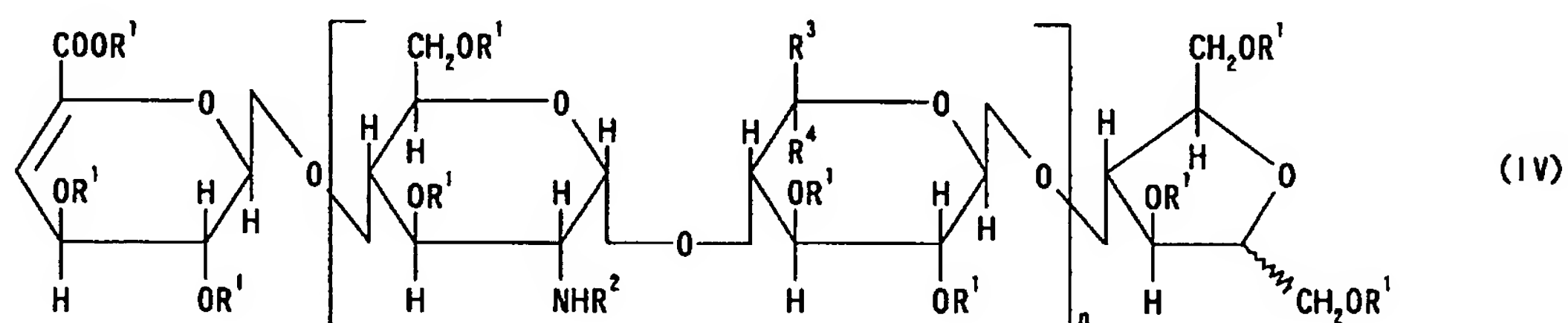
[化3]



(式中、各記号は上記と同じである。);

(d) 式(IV)

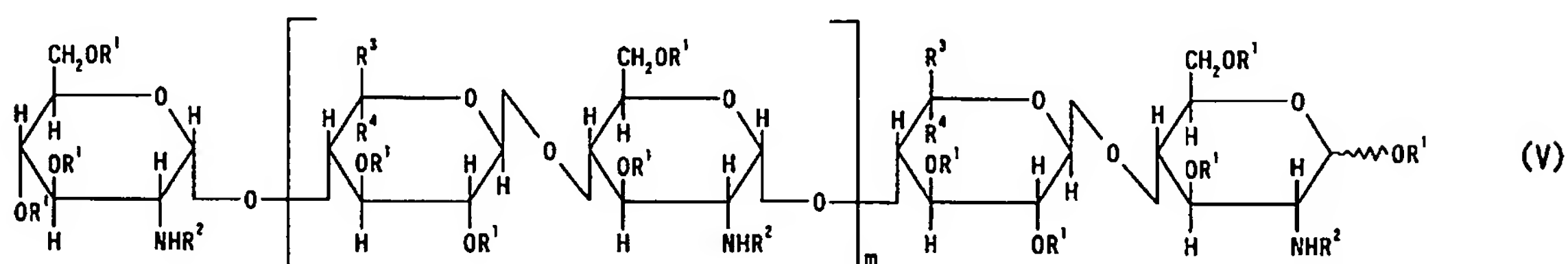
[化4]



(式中、各記号は上記と同じである。);

(e) 式(V)

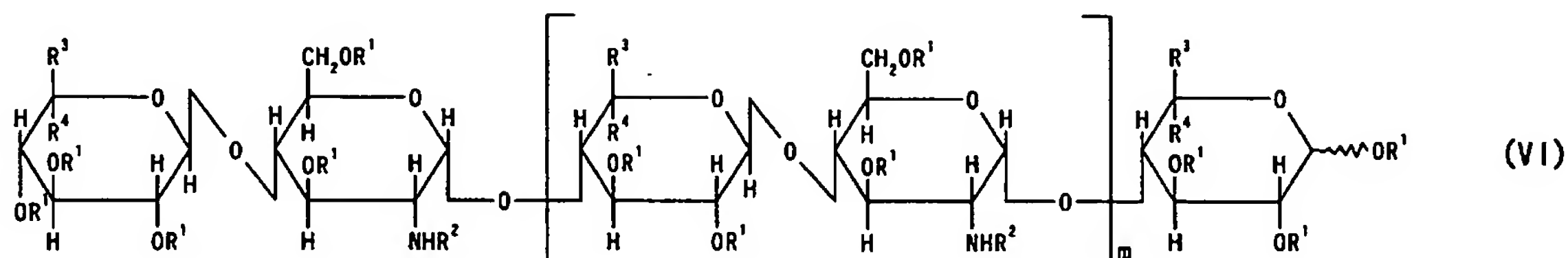
[化5]



(式中、 m は0～6を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は上記と同じである。);

(f) 式(VI)

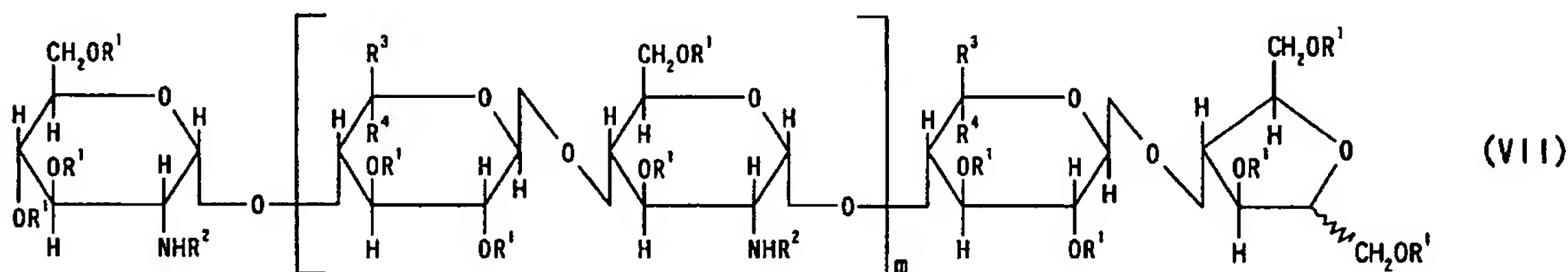
[化6]



(式中、 m は0～6を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は上記と同じである。);

(g) 式(VII)

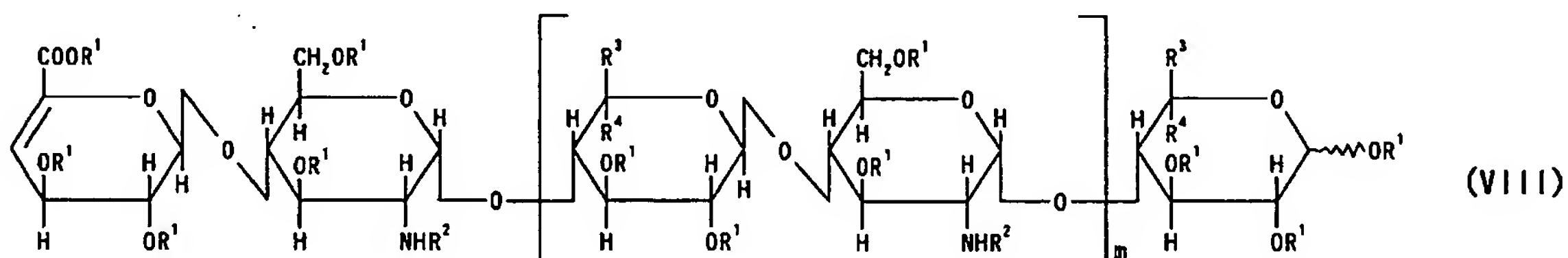
[化7]



(式中、 m は0～6を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は上記と同じである。);又は

(h) 式(VIII)

[化8]



(式中、 m は0～6を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は上記と同じである。)、

- [0012] (8) ウロン酸残基とグルコサミン残基とが $\alpha 1, 4$ -グリコシド結合又は $\beta 1, 4$ -グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する糖鎖化合物(但し、糖鎖化合物中、少なくとも1つのグルコサミン残基の6位のヒドロキシル基が硫酸化されている。)
- 又はその塩を有効成分として含有することを特徴とするHGF産生促進薬剤、
- (9) ウロン酸残基とグルコサミン残基とが $\alpha 1, 4$ -グリコシド結合又は $\beta 1, 4$ -グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する糖鎖化合物(但し、糖鎖化合物

物中、少なくとも1つのグルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化されている。)又はその塩を有効成分として含有することを特徴とするHGF産生促進薬剤、

(10) ウロン酸残基と、6位のヒドロキシル基又は2位のアミノ基が硫酸化されているグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合してなる2糖化合物又はその塩を有効成分として含有することを特徴とするHGF産生促進薬剤、及び

(11) 糖鎖化合物又はその塩が、抗血液凝固作用及びリポプロテインリパーゼ放出作用を有さないか、それらの作用が抑制されていることを特徴とする請求の範囲第1～10項のいずれかに記載のHGF産生促進薬剤に関する。

[0013] また、本発明は、

(12) ウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合もしくは β 1, 4-グリコシド結合してなる2糖、又はウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合もしくは β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する3乃至16糖のオリゴ糖又はその塩であって、

ウロン酸残基及びグルコサミン残基の少なくとも1つのヒドロキシル基が硫酸化、アルキル化、アシル化又はアミノ化されていてもよく、少なくとも1つのグルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化、アルキル化又はアシル化されていてもよいオリゴ糖又はその塩の有効量を、哺乳動物に投与することを特徴とするHGF産生促進方法、

(13) 少なくとも1つのウロン酸残基の2位及び／又は少なくとも1つのグルコサミン残基の3位及び／又は6位のヒドロキシル基が硫酸化されていてもよいことを特徴とする上記(12)に記載のHGF産生促進方法、

(14) 少なくとも1つのグルコサミン残基において、6位のヒドロキシル基及び／又は2位のアミノ基が硫酸化されていることを特徴とする上記(12)に記載のHGF産生促進方法、

(15) 2乃至10糖からなるオリゴ糖であることを特徴とする上記(12)に記載のHGF産生促進方法、

(16) オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸のヘパリナーゼ又はヘ

パリチナーゼ分解物であることを特徴とする上記(12)に記載の産生促進方法、

(17) オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸の亜硝酸分解法、過酸化水素分解法又は β 脱離のいずれかによる分解物であることを特徴とする上記(12)に記載のHGF産生促進方法、

(18) オリゴ糖が、次の(a)～(h)で表される化合物のいずれかであることを特徴とする上記(12)に記載のHGF産生促進方法；

(a) 上記式(I)；

(b) 上記式(II)；

(c) 上記式(III)；

(d) 上記式(IV)；

(e) 上記式(V)；

(f) 上記式(VI)；

(g) 上記式(VII)；又は

(h) 上記式(VIII)、

(19) ウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する糖鎖化合物(但し、糖鎖化合物中、少なくとも1つのグルコサミン残基の6位のヒドロキシル基が硫酸化されている。)又はその塩の有効量を、哺乳動物に投与することを特徴とするHGF産生促進方法、

(20) ウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する糖鎖化合物(但し、糖鎖化合物中、少なくとも1つのグルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化されている。)又はその塩の有効量を、哺乳動物に投与することを特徴とするHGF産生促進方法、

(21) ウロン酸残基と、6位のヒドロキシル基又は2位のアミノ基が硫酸化されているグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合してなる2糖化合物又はその塩の有効量を、哺乳動物に投与することを特徴とするHGF産生促進方法、及び

(22) 糖鎖化合物又はその塩が、抗血液凝固作用及びリポプロテインリパーゼ放出

作用を有さないか、それらの作用が抑制されていることを特徴とする上記(12)～(21)のいずれかに記載のHGF産生促進方法、
に関する。

[0014] また、本発明は、

(23) HGF産生促進医薬を製造するための、ウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合もしくは β 1, 4-グリコシド結合してなる2糖、又はウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合もしくは β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する3乃至16糖のオリゴ糖又はその塩であって、

ウロン酸残基及びグルコサミン残基の少なくとも1つのヒドロキシル基が硫酸化、アルキル化、アシル化又はアミノ化されていてもよく、少なくとも1つのグルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化、アルキル化又はアシル化されていてもよいオリゴ糖又はその塩の使用、

(24) 少なくとも1つのウロン酸残基の2位及び／又は少なくとも1つのグルコサミン残基の3位及び／又は6位のヒドロキシル基が硫酸化されていてもよいことを特徴とする上記(23)に記載の使用、

(25) 少なくとも1つのグルコサミン残基において、6位のヒドロキシル基及び／又は2位のアミノ基が硫酸化されていることを特徴とする上記(23)に記載の使用、

(26) 2乃至10糖からなるオリゴ糖であることを特徴とする上記(23)に記載の使用、

(27) オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸のヘパリナーゼ又はヘパリチナーゼ分解物であることを特徴とする上記(23)に記載の使用、

(28) オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸の亜硝酸分解法、過酸化水素分解法又は β 脱離のいずれかによる分解物であることを特徴とする上記(23)に記載の使用、

(29) オリゴ糖が、次の(a)～(h)で表される化合物のいずれかであることを特徴とする上記(23)に記載の使用；

(a) 上記式(I)；

(b) 上記式(II)；

(c) 上記式(III);

(d) 上記式(IV);

(e) 上記式(V);

(f) 上記式(VI);

(g) 上記式(VII);又は

(h) 上記式(VIII)、

(30) HGF産生促進医薬を製造するための、ウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する糖鎖化合物(但し、糖鎖化合物中、少なくとも1つのグルコサミン残基の6位のヒドロキシル基が硫酸化されている。)又はその塩の使用、

(31) HGF産生促進医薬を製造するための、ウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する糖鎖化合物(但し、糖鎖化合物中、少なくとも1つのグルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化されている。)又はその塩の使用、

(32) HGF産生促進医薬を製造するための、ウロン酸残基と、6位のヒドロキシル基又は2位のアミノ基が硫酸化されているグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合してなる2糖化合物又はその塩の使用、及び

(33) 糖鎖化合物又はその塩が、抗血液凝固作用及びリポプロテインリパーゼ放出作用を有さないか、それらの作用が抑制されていることを特徴とする上記(23)～(32)のいずれかに記載の使用、

に関する。

発明の効果

[0015] 本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖等の糖鎖化合物は、ウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合してなる2糖の繰返しのヘパリン骨格を有するにもかかわらず、出血傾向の副作用を有さないか、抑制しながらHGFの産生を促進することができ、生体の組織、器官等の傷害の治癒を促進することができる等の効果、より具体的には、肝疾患、腎疾患、皮膚疾患、血液疾患、眼疾患、肺疾患、胃十二指腸疾患、癌及びその関連疾患、骨疾患

、中枢疾患等の治療に有用である。

図面の簡単な説明

- [0016] [図1]ヘパリン分解産物のゲル濾過クロマトグラフィーによる分離を示す図である。
- [図2]ヘパリン断片のHGF産生促進活性を示す図である。
- [図3]ヘパリン10糖断片の陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる分離を示す図である。
- [図4]陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによって分離したヘパリン10糖断片のHGF産生促進活性を示す図である。
- [図5]陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによって分離したヘパリン10糖断片のMALDI-TOF/MS解析結果を示す図である。
- [図6]硫酸基の位置の異なる2糖化合物のHGF産生促進活性を示す図である。
- [図7]ヘパリン断片の抗血液凝固活性を活性化部分トロンボプラスチン時間(以下、APTTと略記する。)によって評価した結果を示す図である。
- [図8]ヘパリン断片のLPL放出活性を示す図である。
- [図9]硫酸基の位置の異なる2糖化合物の抗血液凝固活性をAPTTによって評価した結果を示す図である。
- [図10]硫酸基の位置の異なる2糖化合物のリポプロテインリパーゼ(以下、LPLと略記する。)放出活性を示す図である。
- [図11]グルコサミン残基の2位のアミノ基のみが硫酸化されている修飾ヘパリンのHGF産生促進活性を示す図である。
- [図12]グルコサミン残基の2位のアミノ基のみが硫酸化されている修飾ヘパリンの抗血液凝固活性をAPTTによって評価した結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- [0017] 本発明においてヘパリン骨格とは、ウロン酸残基とグルコサミン残基とが $\alpha 1, 4$ -グリコシド結合又は $\beta 1, 4$ -グリコシド結合によって交互に繰り返し結合した構造を有する骨格をいう。

本発明においてウロン酸残基は、L-イズロン酸残基(以下、IdoAと略記する。)及びD-グルクロン酸残基(以下、GlcAと略記する。)のいずれであってもよい。また、I

doA又はGlcAのみで存在してもよく、あるいはIdoAとGlcAが混在していてもよく、IdoAとGlcAの存在比は特に制限はない。

- [0018] また、本発明においてオリゴ糖というときは、ウロン酸とグルコサミンの異なる二糖から構成されるヘテロオリゴ糖をいい、具体的には、ウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合してなる2糖化合物、ウロン酸残基又はグルコサミン残基と前記2糖化合物とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合してなる3糖化合物、或いはウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰り返し結合した構造を有する4～16糖の糖鎖化合物をいう。
- [0019] また、本発明においてアルキル化とは、ウロン酸残基のヒドロキシル基又は／及びグルコサミン残基のヒドロキシル基又は／及びアミノ基の水素がアルキル基、好ましくは低級アルキル基で置換されることをいう。
- [0020] 本発明においてアシル化とは、ウロン酸残基のヒドロキシル基又は／及びグルコサミン残基のヒドロキシル基又は／及びアミノ基の水素が、式 $-(C=O)-R^5$ 、 $-(C=O)-OR^5$ 、 $-(C=O)-NR^5R^6$ 、 $-(C=S)-NHR^5$ 、 $-SO-R^5$ 、 $-SO_2-R^5$ 又は $-SO_2-NHR^5$ (式中、 R^5 及び R^6 は水素原子又は炭化水素基を示す。)で表されるアシル基に置換されることをいう。前記式中、 R^5 及び R^6 で示される炭化水素基としては、例えば、鎖状炭化水素基(例、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基等)などが挙げられる。アルキル基としては低級アルキル基が好ましい。アルケニル基としては、例えば C_{2-6} アルケニル基(例、ビニル、アリル、イソプロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、2-メチル-2-プロペニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル等)などが好ましい。アルキニル基としては、例えば C_{2-6} アルキニル基(例、エチニル、プロパルギル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-ヘキシニル等)などが好ましい。
- [0021] 本発明においてアミノ化とは、ウロン酸残基のヒドロキシル基又は／及びグルコサミン残基のヒドロキシル基の水素が、アミノ基に置換されることをいう。該アミノ基は更に硫酸基、アルキル基、アシル基で置換されていてもよい。

なお、本発明において低級アルキル基とは、炭素数1～6のアルキル基、例えばメ

チル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、2-メチルブチル、ネオペンチル、ヘキシル、4-メチルペンチル、3-メチルペンチル、2-メチルペンチル、1-メチルペンチル、3, 3-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、1, 1-ジメチルブチル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、2, 3-ジメチルブチル、1-エチルブチル、2-エチルブチル等をいう。

[0022] 本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖等の糖鎖化合物を構成するウロン酸残基は、2位及び3位のヒドロキシル基のうち少なくとも1つのヒドロキシル基が硫酸化、アルキル化、アシル化又はアミノ化されていてもよいが、硫酸化がより好ましく、とりわけ2位のヒドロキシル基の硫酸化が好ましい。

[0023] 本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖等の糖鎖化合物を構成するグルコサミン残基は、2位のアミノ基が硫酸化、アルキル化又はアシル化されていてもよいが、硫酸化又はアシル化が好ましい。とりわけ硫酸化が好ましい。アシル化の場合は、 $-(C=O)-R^5$ でアシル化されていることがより好ましく、とりわけアセチルでアシル化されていることが好ましい。

また、グルコサミン残基は、3位及び6位のヒドロキシル基のうち少なくとも1つのヒドロキシル基が硫酸化、アルキル化、アシル化又はアミノ化されていてもよいが、硫酸化が好ましく、とりわけ6位のヒドロキシル基の硫酸化が好ましい。

[0024] 本発明においてオリゴ糖を構成するウロン酸残基とグルコサミン残基の2糖の繰り返し構造は、繰り返し数が多いとHGF産生活性は高くなる。一方、糖の繰り返し数が少ないと、抗血液凝固作用及びLPL放出活性が低下するという特徴を有する。このため、本発明においてオリゴ糖は、HGF産生促進活性を有しかつ、抗血液凝固作用及びLPL放出活性という副作用が低減されているという点で、2乃至16糖が好ましく、2乃至10糖がより好ましい。

本発明のHGF産生促進薬剤に使用される2乃至16糖のオリゴ糖は、分子全体の硫酸化の程度が高いと、HGF産生活性は高くなる。好ましい硫酸化の程度は、2残基当たりに硫酸基が約1～3個である。

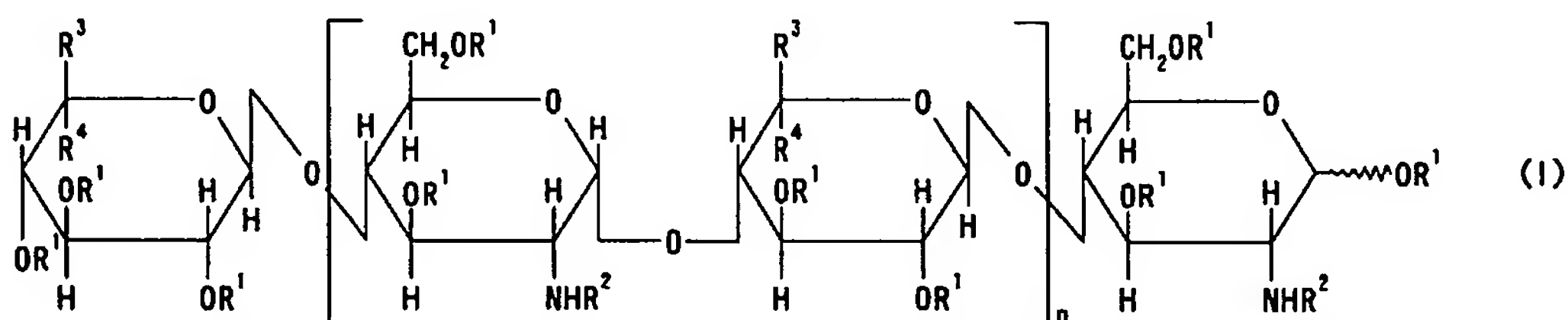
2乃至16糖のオリゴ糖において、硫酸基の位置に特に限定はないが、糖鎖化合物

の中の少なくとも1つのグルコサミン残基の6位のヒドロキシル基又は2位のアミノ基が硫酸化されていることが好ましく、このような硫酸化がなされていれば、糖鎖化合物の他の部位での硫酸化はなくてもよい。2糖化合物の場合においても、少なくともグルコサミン残基の6位のヒドロキシル基及び2位のアミノ基のいずれかが硫酸化されていることが好ましい。

[0025] 本発明のHGF産生促進薬剤に使用される好ましいオリゴ糖としては、例えば以下で表される化合物及びそれらの塩が例示される。

(a) 式(I)

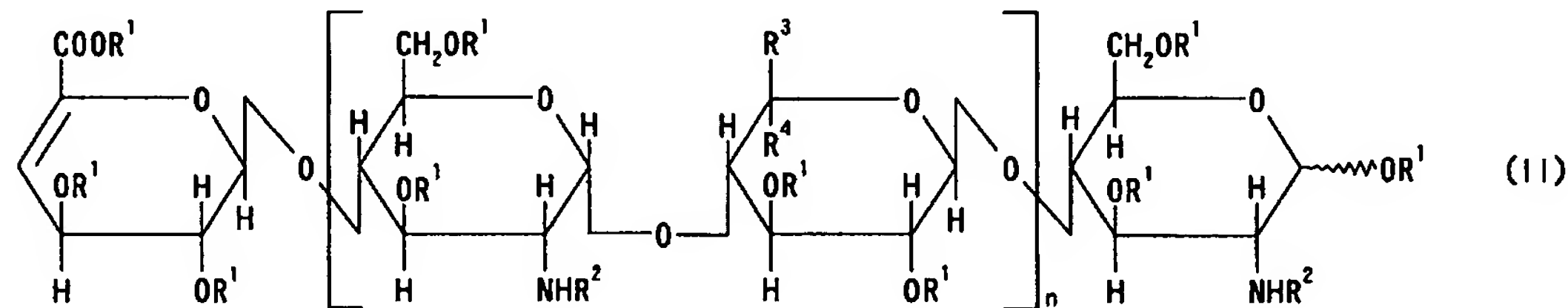
[化9]



(式中、 R^1 は、水素、硫酸基、アルキル基、アシル基又は置換基を有していてもよいアミノ基を示し、 R^2 は、水素、硫酸基、アルキル基又はアシル基を示し、 R^3 及び R^4 は異なって、水素又は置換基を有していてもよいカルボキシル基を示し、 n は0～7を示す。)

[0026] (b) 式(II)

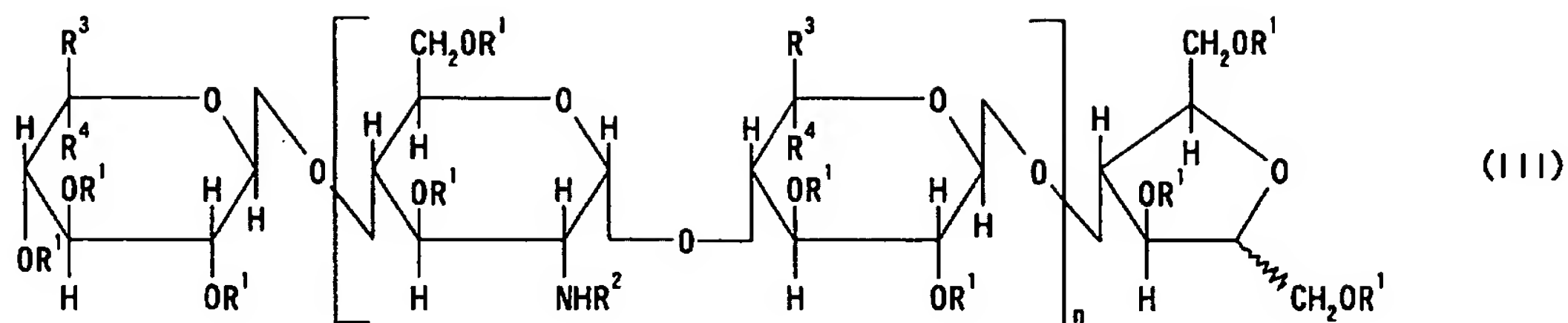
[化10]



(式中、各記号は上記と同じである。)

[0027] (c) 式(III)

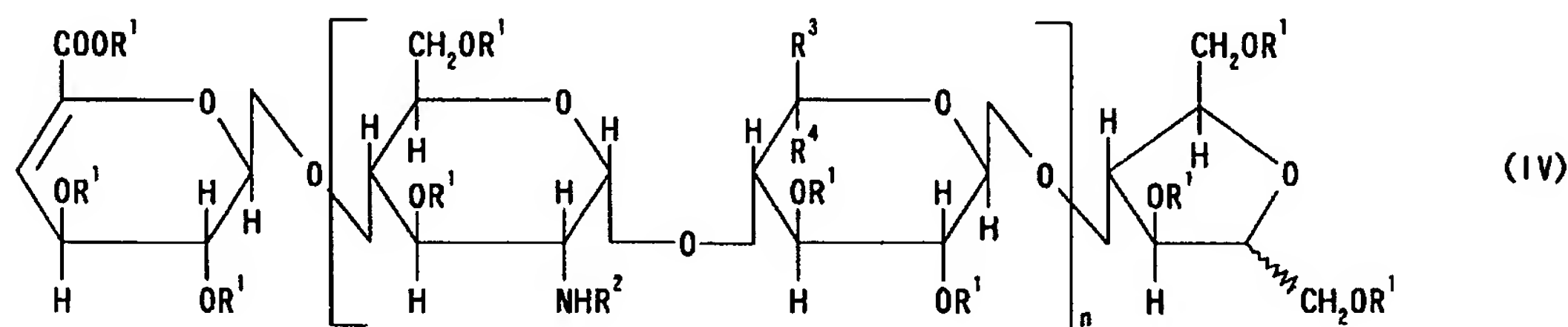
[化11]



(式中、各記号は上記と同じである。)

[0028] (d) 式(IV)

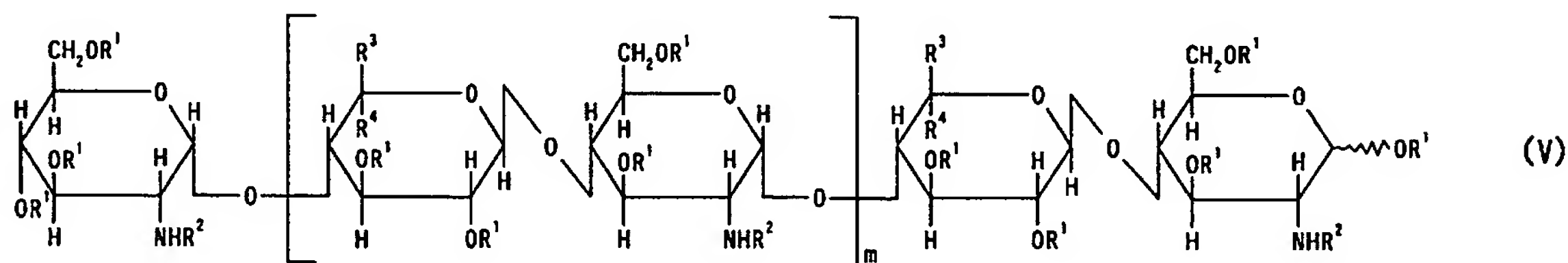
[化12]



(式中、各記号は上記と同じである。)

[0029] (e) 式(V)

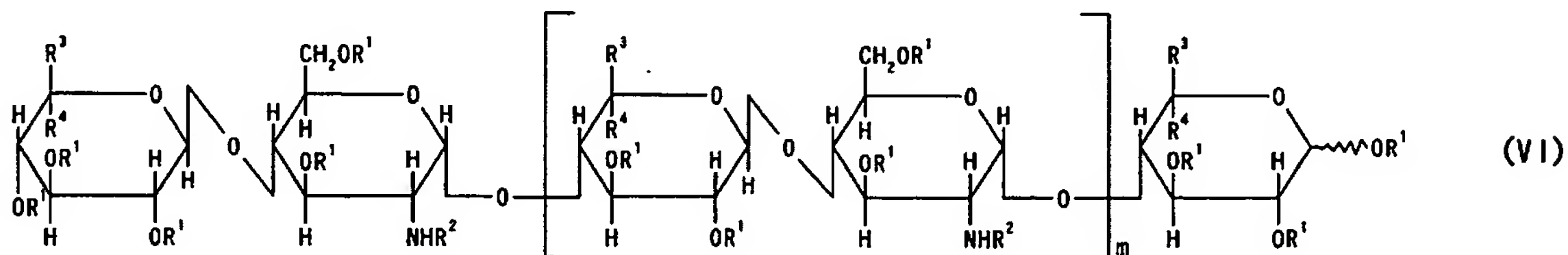
[化13]



(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)

[0030] (f) 式(VI)

[化14]



(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)

は置換基を有していてもよい炭化水素基を示す]で表されるアシル基等が挙げられる。アシル基の中でも、 $-(C=O)-R^3$ が好ましく、アセチルがとりわけ好ましい。前記式中、 R^3 及び R^5 で示される炭化水素基としては、例えば、鎖状炭化水素基(例、アルキル基、アルケニル、アルキニル等)などが挙げられる。アルキル基としては炭素数1～6の低級アルキル基(例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、2-メチルブチル、ネオペンチル、ヘキシル、4-メチルペンチル、3-メチルペンチル、2-メチルペンチル、1-メチルペンチル、3, 3-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、1, 1-ジメチルブチル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、2, 3-ジメチルブチル、1-エチルブチル、2-エチルブチル等)などが好ましい。アルケニルとしては、例えば C_{2-6} アルケニル(例、ビニル、アリル、イソプロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、2-メチル-2-プロペニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル等)などが好ましい。アルキニルとしては、例えば C_{2-6} アルキニル(例、エチニル、プロパルギル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-ヘキシニル等)などが好ましい。

[0035] 上記式(I)～(VIII)で示される R^2 で示されるアミノ基に、置換してもよい置換基としては、硫酸基、アルキル基、アシル基が挙げられるが、硫酸基又はアシル基が好ましい。特に硫酸基が好ましい。アシル基は、 $-(C=O)-R^5$ がより好ましく、とりわけアセチルが好ましい。該アルキル基及びアシル基は上述の R^1 及び R^2 のアルキル基及びアシル基と同義である。

R^1 と R^2 の好ましい組み合わせとしては、 R^1 が水素又は硫酸基であり、 R^2 が水素、硫酸基又はアシル基が好ましい。この場合、アシル基は $-(C=O)-R^3$ が好ましく、とりわけアセチルが好ましい。

n は0～7、好ましくは0～4である。 m は0～6、好ましくは0～4である。

[0036] 上記オリゴ糖、例えば上記式(I)～(VIII)で示される化合物の塩としては、例えばリチウム、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩、例えばカルシウム等のアルカリ土類金属塩、例えば無機酸塩(例えば、塩酸塩、硫酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩等)、有機酸塩(例えば、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル

酸塩、プロピオン酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、乳酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩等)等の酸付加塩等が挙げられる。

[0037] 本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖又はその塩は、通常ヘパリン又はヘパラン硫酸から製造される。ヘパリンは、高分子ヘパリンでも低分子ヘパリンでもよく、ヘパラン硫酸は、高分子ヘパラン硫酸でも低分子ヘパラン硫酸でもよい。本発明で使用されるオリゴ糖又はその塩は、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸を断片化して得られる。原料となる高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸は、生体材料から抽出して得られるものであってもよく、化学合成によって製造されたヘパリン又はヘパラン硫酸及びそれらの類似物質であってもよい。

[0038] 原料となる高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸を生体材料から抽出して得る場合は、ヒト組織を含む種々の哺乳動物組織(例えば、脾臓、肺臓、筋肉等)から得ることができるが、一般にはブタやヒツジの腸粘膜又はウシの肺起源のものが用いられる。好ましいヘパリン供給源は、ブタの腸粘膜である。一般にヘパリンは、材料となる組織を自己分解させ、該組織をアルカリで抽出し、次いで蛋白を凝固させ、次いで酸化により上清からヘパリン-蛋白コンプレックスを沈澱させることによって選択した組織供給源から製造される。該コンプレックスはエタノールやアセトンもしくはその混合物のような極性非水性溶媒を用いて再沈澱させることによって回収され、エタノールのような有機溶媒で抽出して脂肪を除去し、例えばトリプシンのような蛋白分解酵素で処理して蛋白を除去する。ヘパリンを調製する方法は、例えば第14改正日本薬局方解説書、Charles, A. F. らの論文(Biochem. J. 1936年, 第30巻, p. 1927-1933)に記載されており、Chemistry and Biology of Heparin(1981年)(Lundblad, R. L. ら編、Elsevier Publishers, North Holland, New York)中に開示されているような基本的方法を改良したものが知られている。一般には、ヘパリンを抗血液凝固剤として製造するための通常の方法で組織から得ることができる(非特許文献7)。

[0039] 上記のように、生体材料から抽出して得られる高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸は、ウロン酸(IdoA又はGlcA)とグルコサミンからなる二糖を構成単位として、該二糖の繰り返しからなる多糖である。GlcAとIdoAはヘパリン及びヘパラン硫酸のい

ずれにも存在する。ヘパリンでは、ウロン酸としてIdoAが多く含まれ、ヘパラン硫酸ではGlcAが多い。GlcAとIdoAが混在するのは、一部のGlcA残基の5炭素がエピマー化し、IdoAに変換されるためである。ヘパラン硫酸がよりヘパリン様になるにつれてIdoA/GlcA比は上昇する。

[0040] また、原料となる高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸は化学的に合成されたヘパリン又はヘパラン硫酸類似物質でもよく、この場合は上記のような天然の組成ではないことがあるが、一般にヘパリン又はヘパラン硫酸類似物質と称されるものは本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖又はその塩の原料として用いることができる。

また、本発明では、分子量が3000－6000の低分子ヘパリン又は低分子ヘパラン硫酸を原料とすることもできる。分子量が3000－6000の低分子ヘパリンは、第Xa因子抑制作用が強い一方、抗トロンビン作用は弱く、出血リスクの少ない低分子ヘパリンとして臨床に応用されている。分子量が3000－6000の低分子ヘパリンは、血小板凝集作用は弱く、またLPL等を血管壁から遊離させる作用も弱く、皮下注射での吸収もよい等の点から近年利用が進んでいる。本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖又はその塩は、分子量が3000－6000の低分子のヘパリン又は低分子ヘパラン硫酸よりもさらに低分子でもよく、従来一般に低分子ヘパリン又は低分子ヘパラン硫酸と呼ばれているものであっても、本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖又はその塩の原料とすることができる。

[0041] 高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸あるいは分子量が3000－6000の低分子ヘパリンを断片化する方法としては、酵素的にグリコシド結合を分解するか又は化学的に分解する方法が挙げられる。酵素的に分解する場合は、ヘパリナーゼ又はヘパリチナーゼ等の酵素が用いられ、例えばヘパリチナーゼI、ヘパリチナーゼII、及びヘパリナーゼ等のヘパリン骨格を低分子化するヘパリン分解酵素を用いて高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸を分解する方法で調製することができる。通常は、消化前の高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸100mgに対して約0.02～2.0 U、好ましくは約0.1～1.0 Uの酵素を用いて約20～45℃、好ましくは約30～40℃で3時間以上、好ましくは6時間以上、より好ましくは約8～12時間反応させることで

調製することができるが、上記条件に限定はされず条件は適宜選択することが可能である。化学的に分解する場合は、例えば亜硝酸分解法、過酸化水素分解法、 β 脱離法等の公知の方法が用いられる(非特許文献7)。

[0042] 断片化された高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸の混合物から、本発明で使用するオリゴ糖又はその塩を取得、精製するためには、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等を単独又は組み合わせて行うことができる。例えばゲル濾過クロマトグラフィーに、例えばアマシャムバイオサイエンス社製のSuperdex 30pgカラム(カラム1.6cm×60cm、流速0.4mL/分)を用いる場合には、16糖画分は約135～138分、14糖画分は約140～144分、12糖画分は約146～151分、10糖画分は約154～161分、8糖画分は約163～172分、6糖画分は約175～188分、4糖画分は約190～209分、2糖画分は約216～249分で溶出されうる。例えば上記の分画によって得られたオリゴ糖をイオン交換クロマトグラフィー等によりさらに分離することで均一構造の物質からなる画分を得ることが可能である。イオン交換クロマトグラフィーを用いる場合は、溶液中の塩濃度が高くなるが多いため、得られた画分を常法により脱塩することが好ましい。

なお、精製のプロセス中にアンチトロンビンIIIを固定化したカラム等の工程を組み込むと、該カラムに非吸着の画分を回収することにより、Xa因子抑制活性を有する画分が除去された画分を得ることができ、抗血液凝固活性が完全に除去されたオリゴ糖を調製することができるのでより好ましい。アンチトロンビンIII非吸着のオリゴ糖であってもHGF産生促進は保持されているため、本発明に適用できる。

また、上記方法により、得られたオリゴ糖を自体公知の方法に従い、硫酸化、アルキル化、アシル化又はアミノ化することもできる。

[0043] 本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖又はその塩は、化学合成によって人工的に合成してもよい。例えば、IdoA又はGlcAあるいはそれらの誘導体と、グルコサミンあるいはその誘導体等から単位2糖を合成し、これを重合させて合成することができる(Karst, N. A. and Linhardt, R. J., Curr. Med. Chem., 2003年, 第10巻, p. 1993-2031、Lee, J. C., J. Am. Chem. Soc., 2004年, 第126巻, p. 476-7)。あるいは、酵素反応を組み合わせたchemoenzymaticな合成

を行ってもよい(Kuberan, B. et al., J. Biol. Chem., 2003年, 第278巻, p. 52613-21)。このような化学合成やchemoenzymaticな合成は、特にグルコサミン残基の6位のヒドロキシル基又はグルコサミン残基の2位のアミノ基を選択的に硫酸化する上で有効である。

- [0044] また、本発明のHGF産生活性促進薬剤は、上記のようにして得られるオリゴ糖に限られない。ウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合によって交互に結合した構造を有する17糖以上の糖鎖化合物であつて、該糖鎖化合物中、少なくとも1つのグルコサミン残基の6位のヒドロキシル基が硫酸化されているか、或いは少なくとも1つのグルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化されており、他のヒドロキシル基やアミノ基が硫酸化されていない糖鎖化合物は、HGF産生促進活性を保持している一方で、抗血液凝固作用及びLPL放出活性はヘパリンに比べて低下していることから、本発明のHGF産生活性促進薬剤に使用できる。そのような糖鎖化合物は上記のヘパリン又はヘパラン硫酸を例えば化学的に修飾することによって調製することができる。

17糖以上の糖鎖化合物の糖鎖としては、通常500糖以下、好ましくは300糖以下、より好ましくは200糖以下である。

17糖以上の糖鎖化合物の塩としては、上記オリゴ糖の塩として例示したものが挙げられる。

- [0045] 本発明のHGF産生促進薬剤によるHGF産生促進活性の測定は、上記オリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩をHGF産生細胞に添加して培養した場合と、上記オリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩を加えないで培養した培養液中のHGF濃度をELISA法で測定し、それらの値を比較することで判定できる。HGF産生細胞としては、ヒト胎児肺線維芽細胞であるMRC-5やMRC-9等の細胞株を用いることができる。

- [0046] 本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩における抗血液凝固作用は、従来の低分子ヘパリンの抗血液凝固活性を測定するために実施されている方法に従って、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)あるいは抗Xa活性を測定することで評価できる。

本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩に

おけるLPL放出活性は上記オリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩をマウス又はラット等に投与して一定時間後に血漿を採取し、該血漿中のLPL量を測定することで評価できる。血漿中のLPL量の測定は、LPL活性を測定するか、又はELISAによってLPLタンパク質量として測定することができる。

[0047] 本発明のHGF産生促進薬剤は、HGFの産生を促進することから、HGFの薬理作用を介して、各種疾患の予防・治療に有効である。本発明のHGF産生促進薬剤は、例えば、肝疾患治療剤、腎疾患治療剤、創傷治療剤、皮膚潰瘍治療剤、毛根細胞増殖剤、制ガン剤、肺傷害治療剤、ガン療法用副作用防止剤等の用途を有し、より具体的には、例えば、肝疾患(例えば、肝炎、肝硬変、肝不全、外科手術後の肝再生等)、腎疾患(例えば、糸球体腎炎、腎不全、腎性貧血症、糖尿病性腎症、薬剤投与後の腎傷害等)、皮膚疾患(例えば、白斑病、熱傷、床擦れ、皮膚潰瘍、禿頭症等)、血液疾患(例えば、血小板減少症、骨髄移植等)、眼疾患(例えば、角膜潰瘍等)、肺疾患(例えば、肺炎、肺気腫、肺結核、慢性閉塞性肺疾患、塵肺、肺線維症等)、胃十二指腸疾患(例えば、胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍等)、癌疾患及びその関連疾患(例えば、各種癌、癌療法による副作用、例えば肝毒性、腎毒性、悪心、嘔吐、血小板減少、脱毛等の予防等)、骨疾患(例えば、骨粗鬆症、骨異形成症、変形性関節炎等)、中枢疾患(例えば、神経分化異常症等)などの疾患の予防・治療に有用である。

[0048] 本発明のHGF産生促進薬剤は種々の製剤形態(例えば、注射剤、固形剤、カプセル剤等)をとりうるが、上記オリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩又は慣用の担体と共に注射剤とされるのが好ましい。当該注射剤は常法により調製することができ、注射剤中の上記オリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩の濃度は、0.0001～5W/V%程度の範囲から適宜調整される。注射剤は、例えば、上記のオリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩を適切な溶剤(例えば、滅菌水、緩衝液、生理食塩水等)に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。慣用の担体としては、好ましくは安定化剤が挙げられる。安定化剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、マンニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコール等が挙げられる。さらに、製剤化に必要な医薬上許容さ

れる添加剤、例えば等張化剤(塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ホウ砂、ブドウ糖、プロピレングリコール等)、緩衝剤(リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸緩衝液、イプシロンアミノカプロン酸緩衝液等)、保存剤(パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂等)、増粘剤(ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等)、安定化剤(亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン等)、pH調整剤(塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸等)などを適宜添加した溶液に、上記オリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩を溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。また適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等)、非イオン界面活性剤(ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油50等)などを使用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプル又はバイアルに充填される。なお、注射剤等の液状製剤は、凍結保存又は凍結乾燥等により水分を除去して保存するのが望ましい。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水等を加え、再溶解して使用される。

- [0049] また、本発明のHGF産生促進薬剤は、外用剤、例えば軟膏状、ゲル状、液状等に製剤化される。外用剤は、例えば軟膏基剤(吸水軟膏、浸水軟膏、マクロゴール、精製ラノリン等)にオリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩を練合して調製される。また、硬化剤(セタノール、ステアリルアルコール等)や、ゲル状とする場合には、増粘剤(カルメロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポピドン等)などを使用することができる。外用剤中の有効成分含量は、外用薬の適用疾患、適用部位等に応じて0.0001～5 W/W%程度の範囲から適宜調整することができる。

本発明のHGF産生促進薬剤は、該製剤の形態に応じた適当な投与経路により哺乳動物(例えば、ヒト、イヌ、ラット、マウス、ウサギ等)に投与され得る。例えば、注射

剤の形態にして静脈、動脈、皮下、筋肉内等に投与することができる。その投与量は、患者の症状、年齢、体重等により適宜調整される。その投与量は、患者の症状、年齢、体重等により適宜調整されるが、通常0.001mg～500mg、好ましくは0.01mg～100mgであり、これを1日1回ないし数回に分けて投与するのが適当である。

[0050] 本発明のHGF産生促進薬剤は、上記オリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩とHGFの混合製剤であってもよい。HGFをヘパリン又はヘパラン硫酸との複合体として生体に投与すると、HGFの血中半減期が延長されることが知られている(Kato, Y. et al., Hepatology, 1994年, 第20巻, p. 417-424)ことから、上記オリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩とHGFを混合製剤とすることにより、製剤中に含まれるHGFの血中半減期が延長される。この場合、オリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩とHGFの配合比は、HGF1質量に対し、通常0.00002～50000(W/W)、好ましくは0.01～500(W/W)である。この際、製剤中のオリゴ糖等の糖鎖化合物又はその塩は、同時に生体中の内在性HGFの産生を促進するので、HGFの作用を介した疾患治療・予防においてより効果的である。同様の理由から、本発明のHGF産生促進薬剤を生体に投与する際、別の製剤として同時にHGFを投与することも可能である。

[0051] 以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

なお、実施例で使用する各略号の意味は、次のとおりである。

HGF:肝細胞増殖因子

FCS:牛胎児血清

DMEM培地:ダルベッコ改変イーグル培地

PBS:リン酸緩衝食塩水

ELISA:エンザイムーリンクド・イムノソルベント・アッセイ(enzyme-linked immunosorbent assay)

MALDI-TOF/MS:Matrix-assisted laser desorption ionization-Time of flight mass spectrometry

LPL:リポプロテインリパーゼ

APTT:活性化部分トロンボプラスチン時間

UA:ウロン酸残基

GlcN:グルコサミン残基

Ac:アセチル

Arg:アルギニン

Gly:グリシン

Sac:糖

2S:2- α -硫酸

6S:6- α -硫酸

NS:N-硫酸

実施例 1

- [0052] 高分子のヘパリンNa (Scientific Protein Laboratories, Inc.) 100mgを50 mM酢酸ナトリウム緩衝液(3mM酢酸カルシウムを含む) (pH7. 0) 2mLに溶解し、ヘパリナーゼ(生化学工業)を0. 5unit添加して37℃で10時間反応させた。反応液を100℃で2分間加熱して反応を停止させた。反応液上清の0. 3mLをSuperdex 30pgカラム(ϕ 1. 6cm \times 60cm) (アマシャムバイオサイエンス)に供してゲル濾過クロマトグラフィーを行った。移動相に200mM 重炭酸アンモニウム水溶液を用い、0. 4mL/minの流速で通液した。溶出液の230nmにおける吸光度をモニターし、フラクション(画分)を分画した。溶出されたヘパリン断片を分子サイズごとに回収した。ヘパリン断片は2糖、4糖、6糖、8糖、10糖、12糖、14糖、16糖のオリゴ糖分画面分として得られた(図1)。

実施例 2

- [0053] 実施例1で得られたヘパリン断片(オリゴ糖)を用いてHGF産生促進活性を測定した。活性測定のためには、ヒト胎児肺線維芽細胞であるMRC-9細胞を用い、ヘパリン断片(オリゴ糖)添加時の該細胞のHGF産生量を比較した。まず、MRC-9細胞を 5×10^4 個/cm²の密度で48wellプレートに播種し、10V/V%FCSを含むDME M培地で1日培養した。次に、該細胞の培地を吸引除去し、PBS0. 5mLで2回洗浄した後培地を、10V/V%CSを含むDMEM培地に交換して培養を継続した。この際、培地中に実施例1で得られたヘパリン断片を1 μ g/mlとなるように添加した。24

時間後に培養上清を回収し、培養上清中に分泌されたHGF量を測定した。HGFの定量はELISA法にて行った。市販の低分子ヘパリン(フラグミン、キッセイ薬品工業株式会社製)を添加した場合、HGF産生量は高分子のヘパリン(未分画ヘパリンと呼ぶ)を添加した場合と同等であり、ヘパリン無添加の場合の5倍程度にHGF産生を促進した。実施例1で調製した16糖以下のサイズのヘパリン断片においても、6糖以上のサイズのヘパリン断片においてHGF産生量はヘパリン無添加の場合に比べて上昇していた(図2)。

実施例 3

[0054] 実施例1で得られたヘパリン断片の10糖画分(以下、ヘパリン10糖断片という。)を凍結乾燥した後、 H_2O に溶解した。これをMiniQ4. 5/50カラム(アマシャムバイオサイエンス)に供して陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行い、ヘパリン10糖断片をさらに分離した。溶離液にはNaCl水溶液(流速 0. 5ml/min)を用い、NaCl濃度を0Mから1Mまで直線的に上昇させ、リニアグラジエント溶出法によってヘパリン10糖断片を分離した。このとき、溶出液の230nmにおける吸光度をモニターし、フラクション(画分)を分画した(図3)。ヘパリン10糖断片は多数のピークとして分離されたが、これは硫酸基の数と配置のバリエーションによるものと考えられた。ピークごとに回収し、画分1から38とした。それぞれの画分について実施例2と同様にHGF産生促進活性を測定した(図4)。その結果、HGF産生促進活性はほとんどの画分で認められた。このことから、HGF産生促進活性を発揮する上でヘパリン10糖断片中の何らかの特定の構造が必須の機能を果たしているとは考えにくく、ウロン酸とグルコサミンの繰り返しからなるヘパリン10糖断片の基本構造に硫酸基が適度に配置されていればよいと考えられた。しかしながら、後半の画分(画分No. 24~36)ほどHGF産生促進活性が高い傾向にあることから、硫酸基の数は多い方が、HGF産生促進活性が高いと考えられた。

[0055] 画分No. 24、26、28、31、33に含まれるヘパリン10糖断片について硫酸基の数を求めるため、質量分析装置(UltaFlex;ブルカー社)を用いてMALDI-TOF/MS分析を行った。各画分は透析膜(分画分子量1000)を用いた透析によって脱塩を行った後、凍結乾燥し、 H_2O に溶解してサンプルとした。ヘパリン断片の硫酸基に

よる陰性荷電を中和するため、塩基性ペプチド $(\text{Arg-Gly})_{19}\text{Arg}([\text{M}(\text{質量}) + \text{H}]^+ = 4226.8 (\text{理論値}))$ をサンプルに混合し、カフェイン酸をマトリクスに用いてMALDI-TOF/MS解析を行った(図5)。この解析法では、ヘパリン断片は $(\text{Arg-Gly})_{19}\text{Arg}$ とのコンプレックスとして検出されるので、検出される m/z (質量/電荷) 値から $(\text{Arg-Gly})_{19}\text{Arg}$ の分子量を差し引くことによりヘパリン断片の分子量が算出される。いずれの画分においても複数の m/z シグナルが検出され、複数の成分が混在していることが判明した。画分No. が24から33と後になるほど、 m/z シグナルのパターンが高分子側にシフトしており、後のフラクションほど硫酸基の数が多いことが確認された。分子量から推定される画分No. 24から33の組成を表1に示した。

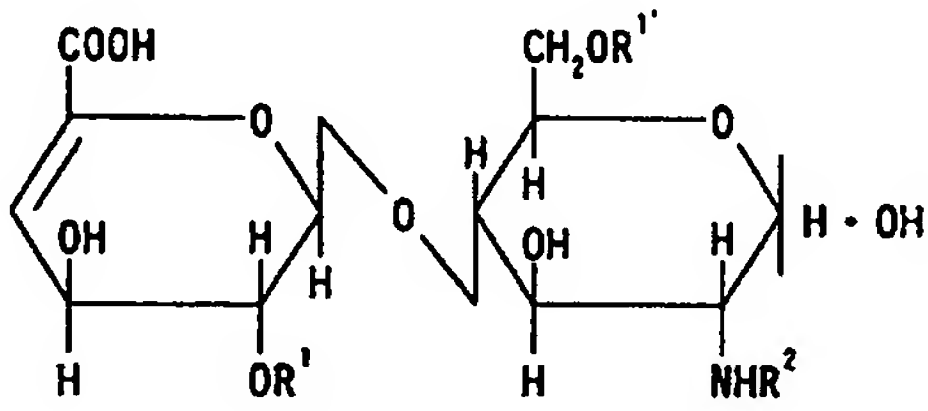
[0056] [表1]

画分 No.	コブ レックス m/z (A)	ヘブ ント m/z 実測値 (B)	グリ糖 分子 (A-B)	ΔUA-GlcNS 415.3	ΔUA-GlcNAc 377.31	H 1.01	SO ₃ H 81.07	SO ₃ H の総数	理論分子 量
24	6481.76	4227.60	2254.16	1	4	6	4	5	2254.91
	6562.05		2334.45	1	4	5	5	6	2334.97
	6641.98		2414.38	1	4	4	6	7	2415.03
	6721.87		2494.27	1	4	3	7	8	2495.09
26	6438.53	4226.80	2211.73	2	3	7	3	6	2212.87
	6560.81		2334.01	1	4	5	5	7	2334.97
	6641.64		2414.84	1	4	4	6	8	2415.03
	6679.42		2452.62	2	3	4	6	9	2453.05
	6721.41		2494.61	1	4	3	7	9	2495.09
	6759.56		2532.76	2	3	3	7	10	2533.11
28	6682.56	4227.64	2454.92	2	3	4	6	8	2453.05
	6724.38		2496.74	1	4	3	7	8	2495.09
	6761.76		2534.12	2	3	3	7	9	2533.11
	6804.03		2576.39	1	4	2	8	9	2575.15
	6843.51		2615.87	2	3	2	8	10	2613.17
30	6639.35	4226.83	2412.52	3	2	5	5	8	2411.01
	6718.81		2491.98	3	2	4	6	9	2491.07
	6757.28		2530.45	4	1	4	6	10	2529.09
	6799.13		2572.30	3	2	3	7	10	2571.13
	6837.67		2610.84	4	1	3	7	11	2609.15
33	6677.32	4226.85	2450.47	4	1	5	5	9	2449.03
	6717.37		2490.52	3	2	4	6	9	2491.07
	6756.57		2529.72	4	1	4	6	10	2529.09
	6797.29		2570.44	3	2	3	7	10	2571.13
	6836.36		2609.51	4	1	3	7	11	2609.15

実施例 4

[0057] 硫酸基の位置の異なる2糖化合物、2-Sac-2S (Heparin disaccharide III-H; Sigma社製)、2-Sac-6S (Δ DiHS-6S; 生化学工業株式会社製)、2-Sac-NS (Δ DiHS-NS; 生化学工業株式会社製) (表2) について、HGF産生促進活性を測定した(図6)。実施例2と同様にしてMRC-9細胞を用いてHGF産生促進活性を測定した。この際、2糖化合物の添加濃度を0~50 μ g/mlの間で変化させた。硫酸基の位置によってHGF産生促進効果が異なり、また、HGF産生促進活性を示すためには、未分画ヘパリンに比べると高い濃度で添加する必要があるが、これらの2糖化合物のいずれにおいてもHGF産生が促進されることが見出された。2-Sac-6Sと2-Sac-NSのHGF産生促進活性は2-Sac-2Sよりも高く、グルコサミン残基の6位のヒドロキシル基の硫酸化、又はグルコサミン残基の2位のアミノ基の硫酸化はHGF産生促進活性を発揮する上で重要であることが見出された。

[0058] [表2]

記号	略式構造			
		R ¹	R ²	R ^{1'}
2-Sac-2S	Δ UA-2S-GlcN	SO ₃ H	H	H
2-Sac-6S	Δ UA-GlcNAc-6S	H	COCH ₃	SO ₃ H
2-Sac-NS	Δ UA-GlcNS	H	SO ₃ H	H

実施例 5

[0059] 実施例1で得られたヘパリン断片(オリゴ糖)について、分子サイズごとに抗血液凝固活性とLPL放出活性を測定した。抗血液凝固活性は活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を比較することで評価した。APTTの測定には、ウイスターラット(雄)から採取した新鮮血漿を用い、エラジン酸による活性化を利用したデータファイ・APTTキット(シスメックス社)を用いた。ラット血漿にヘパリン断片を9 μ g/mL又は3 μ g

／mLとなるように添加し、APTTの値(秒)を比較した。

APTTの測定結果を図7に示す。ヘパリンの代わりに生理食塩水を添加した場合、APTTは約20秒であり、血液は急速に凝固した。血液に未消化の高分子ヘパリン(未分画ヘパリン)を $9\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で加えると、APTTが200秒以上に延長され、血液凝固が阻止された。未分画ヘパリンを $3\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加しても、APTTの延長は160秒以上であり、血液凝固阻害が見られた。市販の低分子ヘパリン(フラグミン、キッセイ薬品工業株式会社製)では、未分画ヘパリンよりもAPTTの延長は抑制されたが、APTTの延長は無視できないレベルであった。実施例1の16糖ヘパリン断片を $9\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で加えた場合では、APTTは約46秒であり、ヘパリン無添加の場合よりAPTTが延長されたものの、APTTの延長の程度はフラグミンよりも短く、抗血液凝固活性は大幅に低下した。さらに、分子サイズが低下するほどAPTTが短縮され、4糖以下では $9\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は $3\mu\text{g}/\text{mL}$ のいずれの添加濃度においても生理食塩水添加の場合のAPTTと同等であった。

- [0060] LPL放出活性の測定のためには、ウイスターラット(3週齢、雄)の尾静脈からヘパリン断片をラットの体重1gあたり $0.3\mu\text{g}$ 投与し、10分後に腋下静脈巣から採血を行って得られる血漿中のLPL量をELISA(第一化学薬品株式会社製)によって測定した。LPL放出量の測定結果を図8に示す。未分画ヘパリンでは $250\text{ng}/\text{mL}$ 程度のLPLが放出されたが、低分子ヘパリン(フラグミン、キッセイ薬品工業株式会社製)ではLPL放出量が高分子ヘパリンの場合の30%程度に低下していた。また実施例1で調製したヘパリン断片でもLPL放出量が低下しており、分子サイズが低下するほどLPL放出量は低下していた。特に8糖以下ではLPL放出量の低下が顕著であった。

実施例 6

- [0061] 実施例1で調製したヘパリン断片の10糖画分について、抗ファクターXa活性と抗ファクターIIa活性を測定し、抗血液凝固活性をさらに詳細に検討した。

抗ファクターXa活性測定のためには、サンプル($22.5\mu\text{L}$)に $2.5\mu\text{L}$ のアンチトロンビンIII(2.5U)を加え、 37°C にて3分間インキュベートした後、血液凝固因子であるファクターXa($7.1\text{nkat S-2222}/\text{mL}$)を $12.5\mu\text{L}$ 加えた。これにファクターXaの基質となるS-2222(第一化学薬品株式会社製)($0.75\text{mg}/\text{mL}$)を $2.5\mu\text{L}$ 加

え、37℃で3分間反応させた。その後、50V/V%酢酸水溶液を37.5 μ L添加して反応を停止し、発色量を405nmの吸光度で測定した。この発色は、ファクターXaの反応によってS-2222から遊離したp-ニトロアニリンによるものである。サンプル中に抗ファクターXa活性を有する物質が含まれている場合の発色量は、サンプル中にファクターXa活性を有する物質が含まれていない場合の発色量に比べて低下する。すなわち、この発色低下量 ΔA_{405} はサンプル中の抗ファクターXa活性を反映する。低分子ヘパリン標準品(国立医薬品食品衛生研究所、抗ファクターXa活性175U/mg、抗ファクターIIa活性69/mg)を用いて抗ファクターXa活性と ΔA_{405} の検量線を作製し、これをもとに非検サンプルの抗ファクターXa活性を求めた。抗ファクターIIa活性の測定は、S-2222、ファクターXa及び50V/V%酢酸の代わりにそれぞれS-2238(第一化学薬品株式会社製)(0.625mg/mL)、血液凝固因子であるファクターIIa(0.4U/mL)及び0.01Mクエン酸を用いて同様に行った。

抗ファクターXa活性と抗ファクターIIa活性の測定結果を表3に示した。市販の低分子ヘパリンであるフラグミンの抗ファクターXa活性とファクター抗IIa活性は、それぞれ未分画ヘパリンの75%、32%に低下していた。一方、ヘパリン10糖断片の抗ファクターXa活性と抗ファクターIIa活性は、それぞれ未分画ヘパリンの12%、4%と著しく低下していた。

[0062] [表3]

	抗ファクター Xa 活性 (U/mg)	抗ファクター IIa 活性 (U/mg)
未分画ヘパリン	203.9 \pm 24.2	184.1 \pm 24.1
フラグミン	152.0 \pm 7.7	58.2 \pm 0.6
ヘパリン 10 糖断片	24.9 \pm 0.9	8.2 \pm 2.6

実施例 7

[0063] 実施例4に記載の硫酸基の位置の異なる2糖化合物、2-Sac-2S(Sigma社製)、2-Sac-6S(生化学工業株式会社製)、2-Sac-NS(生化学工業株式会社製)について、実施例5と同様の方法で抗血液凝固活性とLPL放出活性を測定した(図9、図10)。いずれの2糖化合物においても、抗血液凝固活性とLPL放出活性は検

出されなかった。

実施例 8

- [0064] グルコサミンの2位のアミノ基のみが硫酸化(N-硫酸化のみ)されている修飾ヘパリン(CDSNS-Heparin; 生化学工業株式会社製)について、実施例2と同様にしてMRC-9細胞を用いてHGF産生促進活性を測定した(図11)。この際、グルコサミンの2位のアミノ基のみが硫酸化されている修飾ヘパリンの添加濃度を0~50 μ g/mlの間で変化させた。グルコサミンの2位のアミノ基のみが硫酸化されている修飾ヘパリンは、通常の未分画ヘパリンに比べるとHGF産生が少し弱い、最大活性は通常の未分画ヘパリンと同等であった。また、グルコサミンの2位のアミノ基のみが硫酸化されている修飾ヘパリンの抗血液凝固活性を調べるため、実施例5と同様の方法でAPTTを測定した(図12)。グルコサミンの2位のアミノ基のみが硫酸化されている修飾ヘパリンではAPTTの延長は認められず、抗血液凝固活性は検出されなかった。

産業上の利用可能性

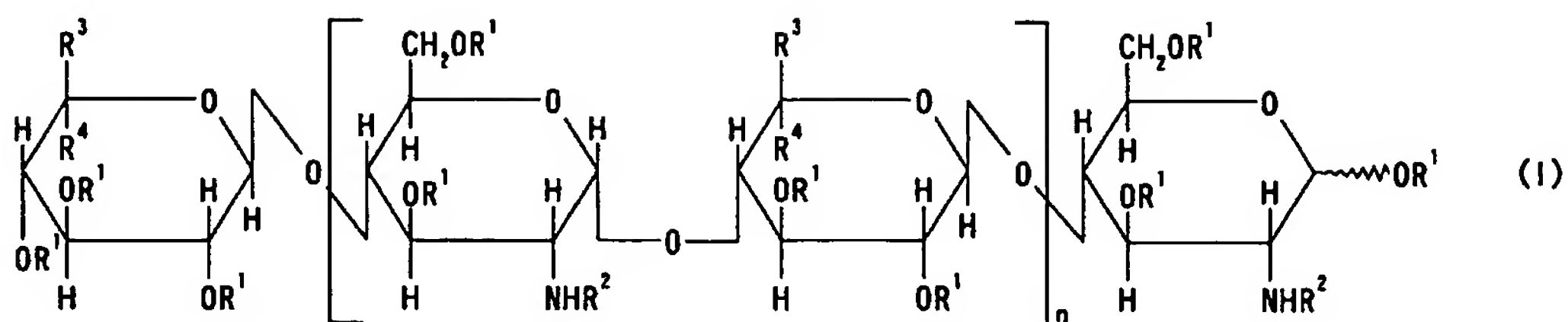
- [0065] 本発明のHGF産生促進薬剤は、出血傾向の副作用を抑制しながらHGFの産生を促進することができ、生体の組織、器官等の傷害の治癒促進に有用である。

請求の範囲

- [1] ウロン酸残基(ウロン酸は、イズロン酸又はグルクロン酸を示す。以下、ウロン酸において同じ。)とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合もしくは β 1, 4-グリコシド結合してなる2糖、又はウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合もしくは β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する3乃至16糖のオリゴ糖又はその塩であって、
ウロン酸残基及びグルコサミン残基の少なくとも1つのヒドロキシル基が硫酸化、アルキル化、アシル化又はアミノ化されていてもよく、少なくとも1つのグルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化、アルキル化又はアシル化されていてもよいオリゴ糖又はその塩を有効成分として含有するHGF産生促進薬剤。
- [2] 少なくとも1つのウロン酸残基の2位及び／又は少なくとも1つのグルコサミン残基の3位及び／又は6位のヒドロキシル基が硫酸化されていてもよいことを特徴とする請求の範囲第1項に記載のHGF産生促進薬剤。
- [3] 少なくとも1つのグルコサミン残基において、6位のヒドロキシル基及び／又は2位のアミノ基が硫酸化されていることを特徴とする請求の範囲第1又は2項に記載のHGF産生促進薬剤。
- [4] 2乃至10糖からなるオリゴ糖であることを特徴とする請求の範囲第1～3項のいずれかに記載のHGF産生促進薬剤。
- [5] オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸のヘパリナーゼ又はヘパリチナーゼ分解物であることを特徴とする請求の範囲第1～4項のいずれかに記載のHGF産生促進薬剤。
- [6] オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸の亜硝酸分解法、過酸化水素分解法又は β 脱離のいずれかによる分解物であることを特徴とする請求の範囲第1～4項のいずれかに記載のHGF産生促進薬剤。
- [7] オリゴ糖が、次の(a)～(h)で表される化合物のいずれかであることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のHGF産生促進薬剤:

(a) 式(I)

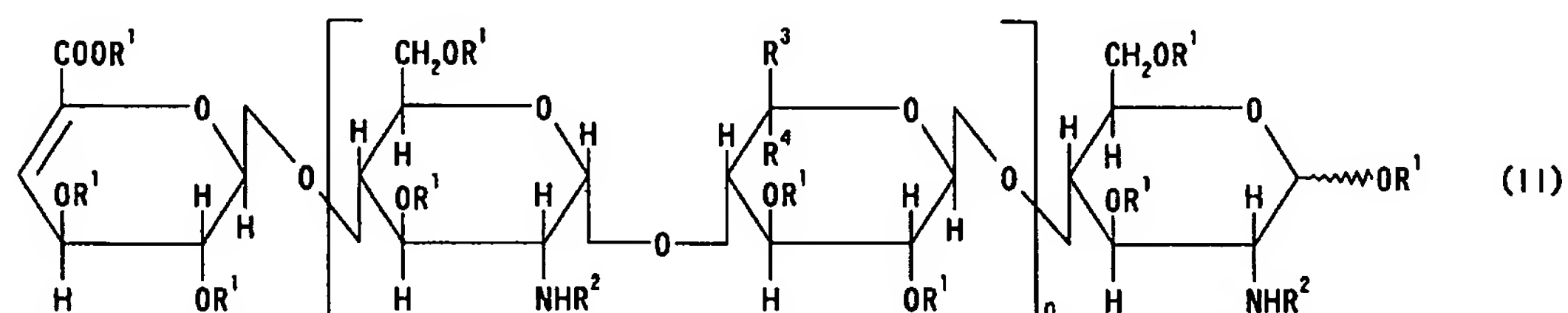
[化1]



(式中、 R^1 は、水素、硫酸基、アルキル基、アシル基又は置換基を有していてもよいアミノ基を示し、 R^2 は、水素、硫酸基、アルキル基又はアシル基を示し、 R^3 及び R^4 は異なって、水素又は置換基を有していてもよいカルボキシル基を示し、 n は0～7を示す。)

(b) 式(II)

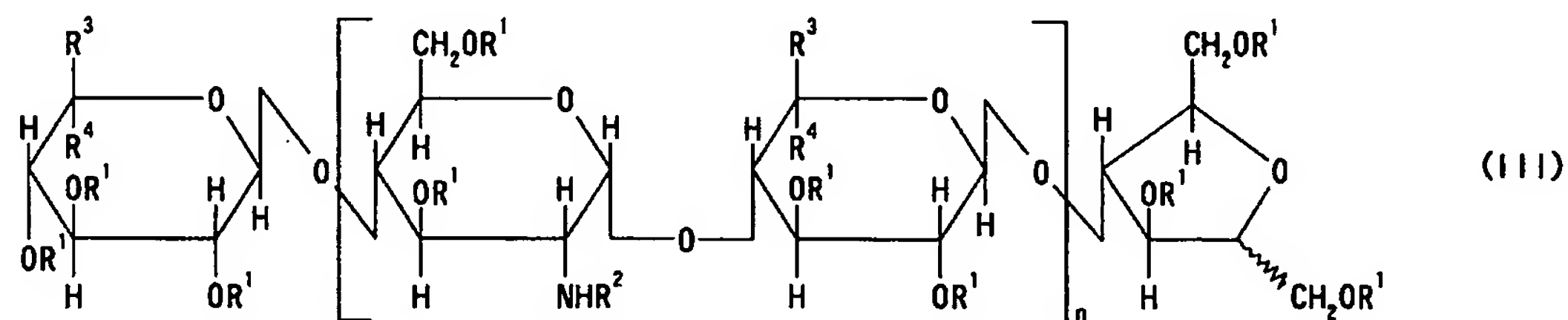
[化2]



(式中、各記号は上記と同じである。)

(c) 式(III)

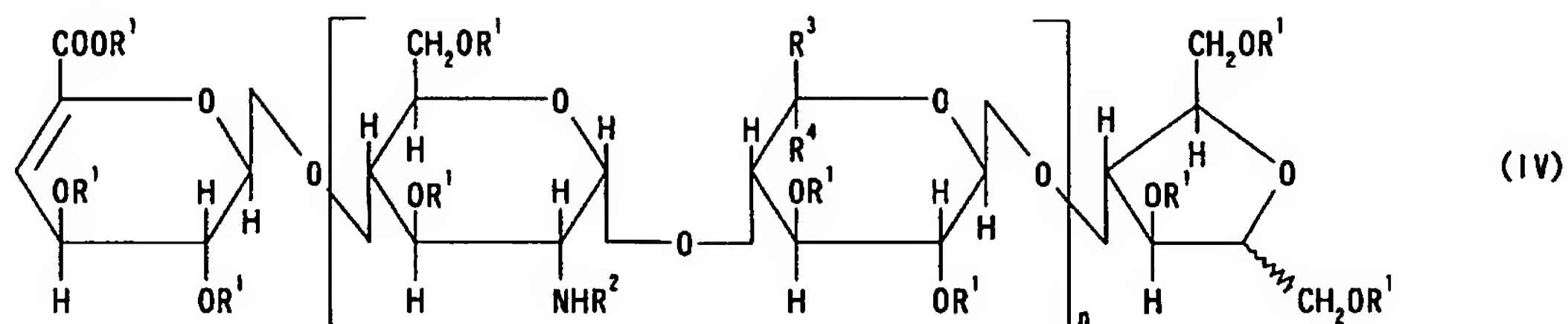
[化3]



(式中、各記号は上記と同じである。)

(d) 式(IV)

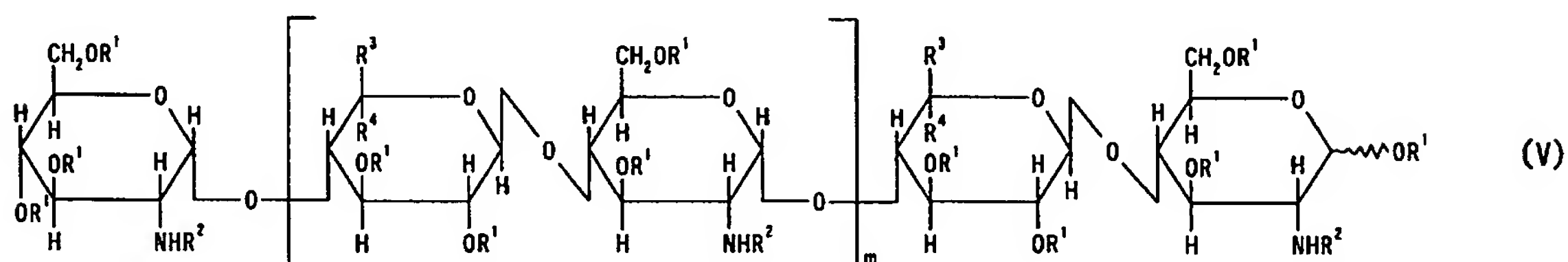
[化4]



(式中、各記号は上記と同じである。)

(e) 式(V)

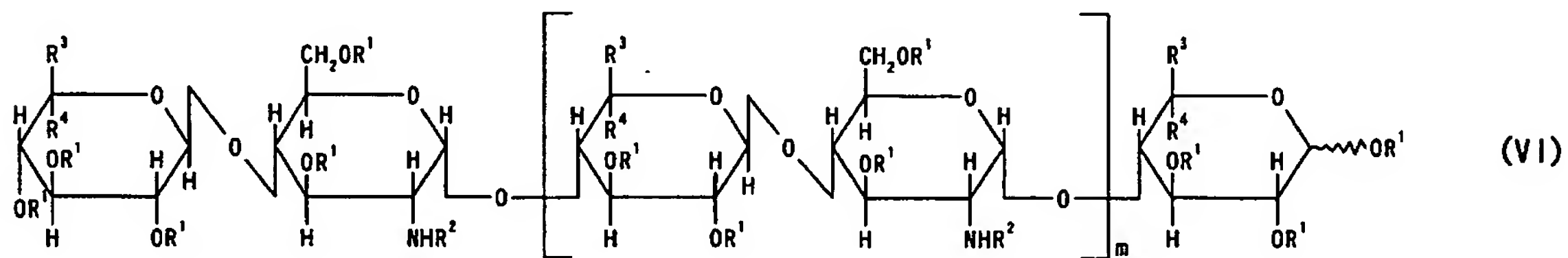
[化5]



(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)

(f) 式(VI)

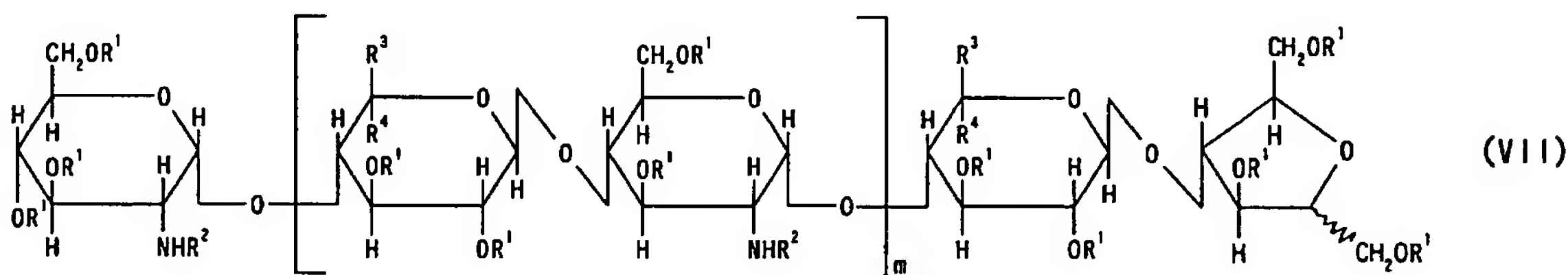
[化6]



(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)

(g) 式(VII)

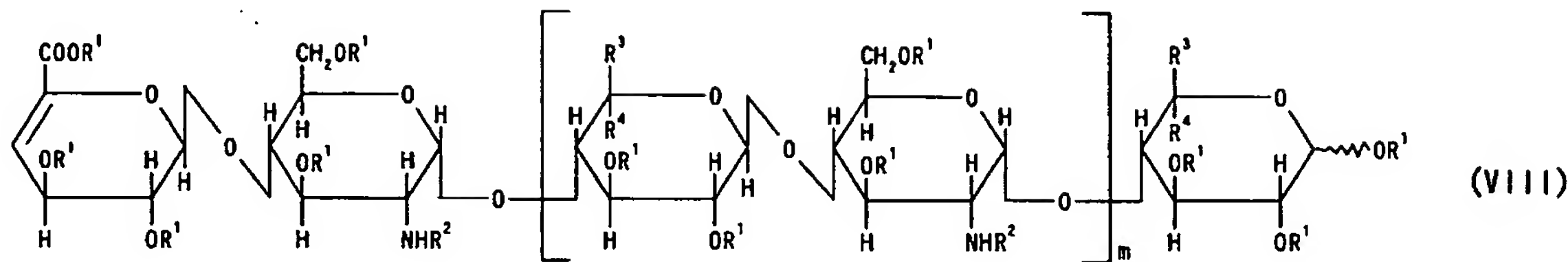
[化7]



(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)、又は

(h) 式(VIII)

[化8]



(式中、 m は0～6を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は上記と同じである。)

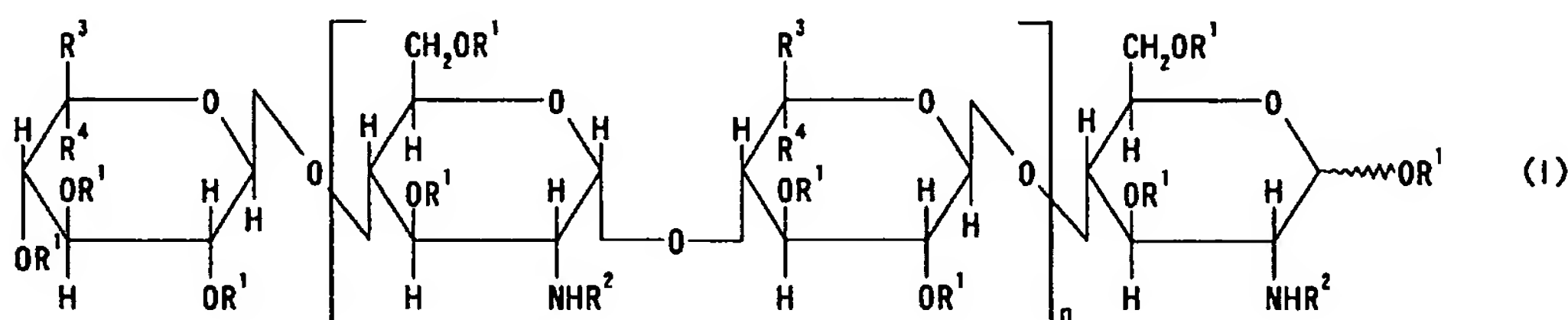
- [8] ウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する糖鎖化合物(但し、糖鎖化合物中、少なくとも1つのグルコサミン残基の6位のヒドロキシル基が硫酸化されている。)又はその塩を有効成分として含有することを特徴とするHGF産生促進薬剤。
- [9] ウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する糖鎖化合物(但し、糖鎖化合物中、少なくとも1つのグルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化されている。)又はその塩を有効成分として含有することを特徴とするHGF産生促進薬剤。
- [10] ウロン酸残基と、6位のヒドロキシル基又は2位のアミノ基が硫酸化されているグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合してなる2糖化合物又はその塩を有効成分として含有することを特徴とするHGF産生促進薬剤。
- [11] 糖鎖化合物又はその塩が、抗血液凝固作用及びリポプロテインリパーゼ放出作用を有さないか、それらの作用が抑制されていることを特徴とする請求の範囲第1～10項のいずれかに記載のHGF産生促進薬剤。
- [12] ウロン酸残基(ウロン酸は、イズロン酸又はグルクロン酸を示す。以下、ウロン酸において同じ。)とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合もしくは β 1, 4-グリコシド結合してなる2糖、又はウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合もしくは β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する3乃至16糖のオリゴ糖又はその塩であって、
ウロン酸残基及びグルコサミン残基の少なくとも1つのヒドロキシル基が硫酸化、アルキル化、アシル化又はアミノ化されていてもよく、少なくとも1つのグルコサミン残基の

2位のアミノ基が硫酸化、アルキル化又はアシル化されていてもよいオリゴ糖又はその塩の有効量を、哺乳動物に投与することを特徴とするHGF産生促進方法。

- [13] 少なくとも1つのウロン酸残基の2位及び／又は少なくとも1つのグルコサミン残基の3位及び／又は6位のヒドロキシル基が硫酸化されていてもよいことを特徴とする請求の範囲第12項に記載のHGF産生促進方法。
- [14] 少なくとも1つのグルコサミン残基において、6位のヒドロキシル基及び／又は2位のアミノ基が硫酸化されていることを特徴とする請求の範囲第12項に記載のHGF産生促進方法。
- [15] 2乃至10糖からなるオリゴ糖であることを特徴とする請求の範囲第12項に記載のHGF産生促進方法。
- [16] オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸のヘパリナーゼ又はヘパリチナーゼ分解物であることを特徴とする請求の範囲第12項に記載の産生促進方法。
- [17] オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸の亜硝酸分解法、過酸化水素分解法又は β 脱離のいずれかによる分解物であることを特徴とする請求の範囲第12項に記載のHGF産生促進方法。
- [18] オリゴ糖が、次の(a)～(h)で表される化合物のいずれかであることを特徴とする請求の範囲第12項に記載のHGF産生促進方法；

(a) 式(I)

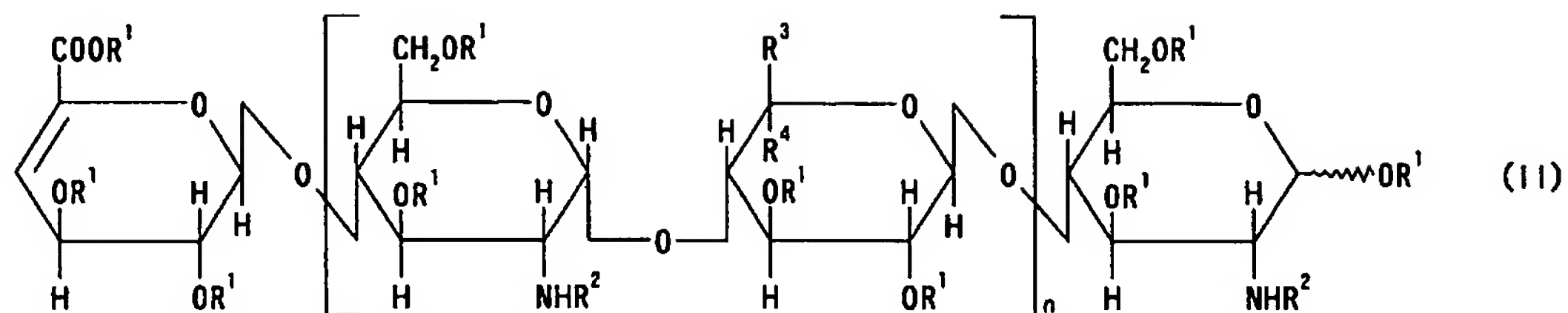
[化1]



(式中、 R^1 は、水素、硫酸基、アルキル基、アシル基又は置換基を有していてもよいアミノ基を示し、 R^2 は、水素、硫酸基、アルキル基又はアシル基を示し、 R^3 及び R^4 は異なって、水素又は置換基を有していてもよいカルボキシル基を示し、 n は0～7を示す。);

(b) 式(II)

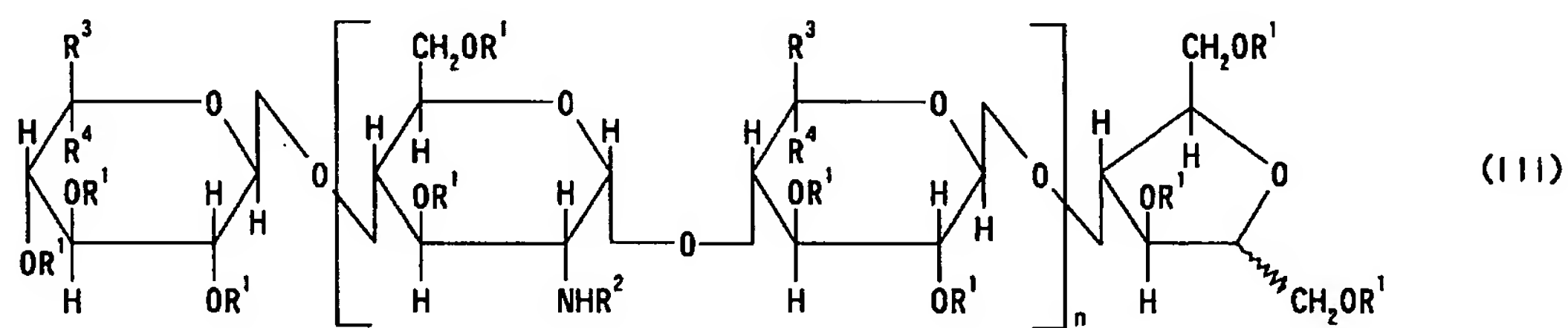
[化2]



(式中、各記号は上記と同じである。);

(c) 式(III)

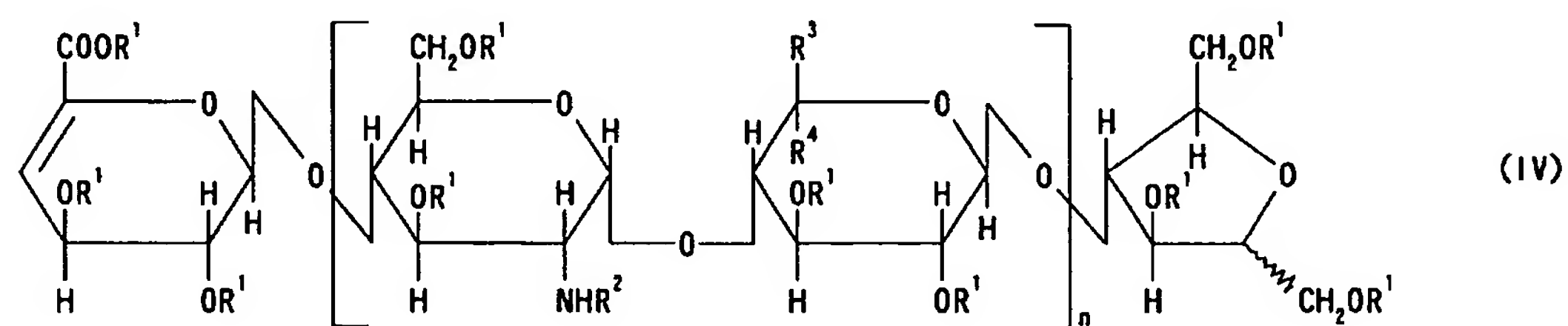
[化3]



(式中、各記号は上記と同じである。);

(d) 式(IV)

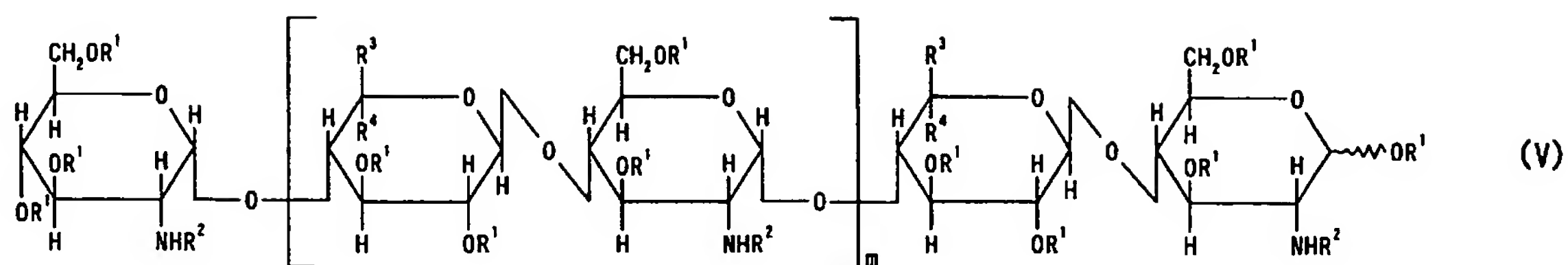
[化4]



(式中、各記号は上記と同じである。);

(e) 式(V)

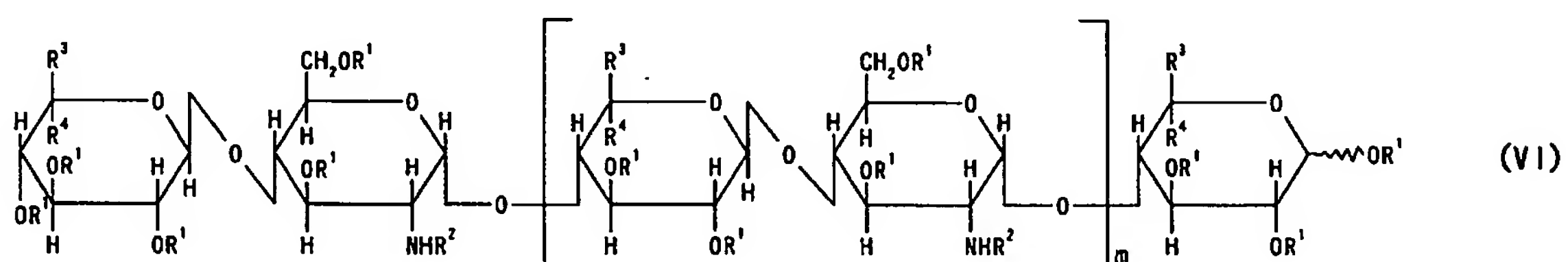
[化5]



(式中、 m は0～6を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は上記と同じである。);

(f) 式(VI)

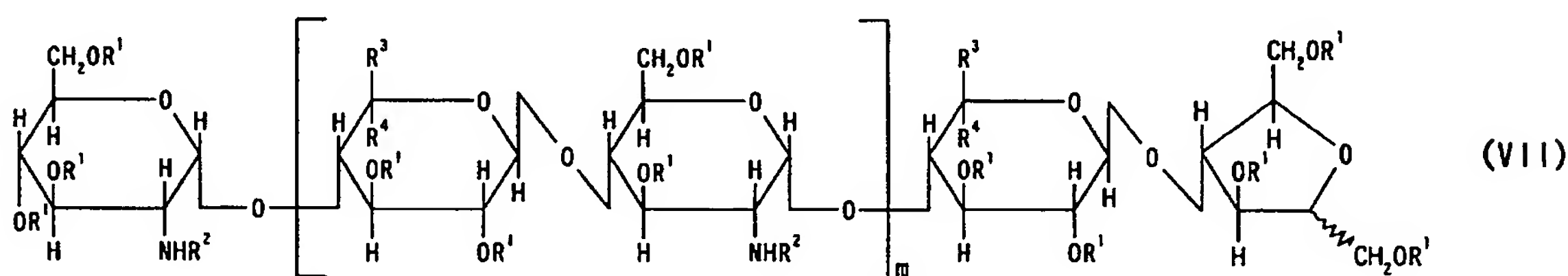
[化6]



(式中、 m は0～6を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は上記と同じである。);

(g) 式(VII)

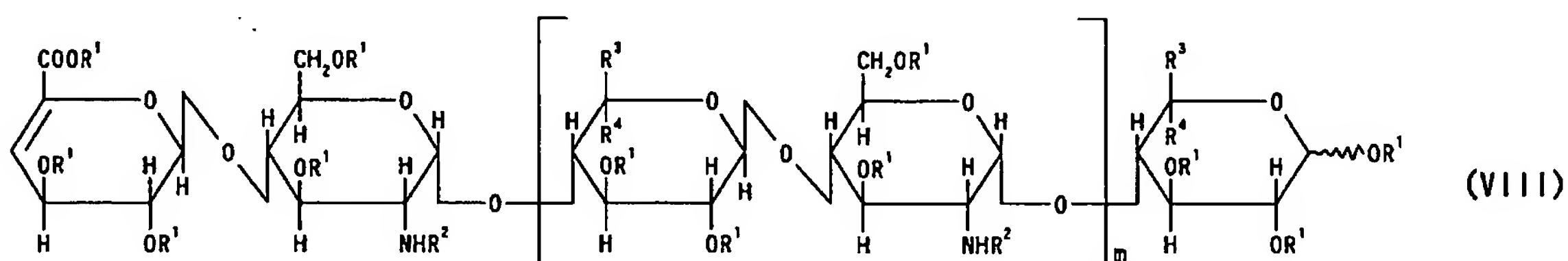
[化7]



(式中、 m は0～6を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は上記と同じである。)、又は

(h) 式(VIII)

[化8]



(式中、 m は0～6を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は上記と同じである。)

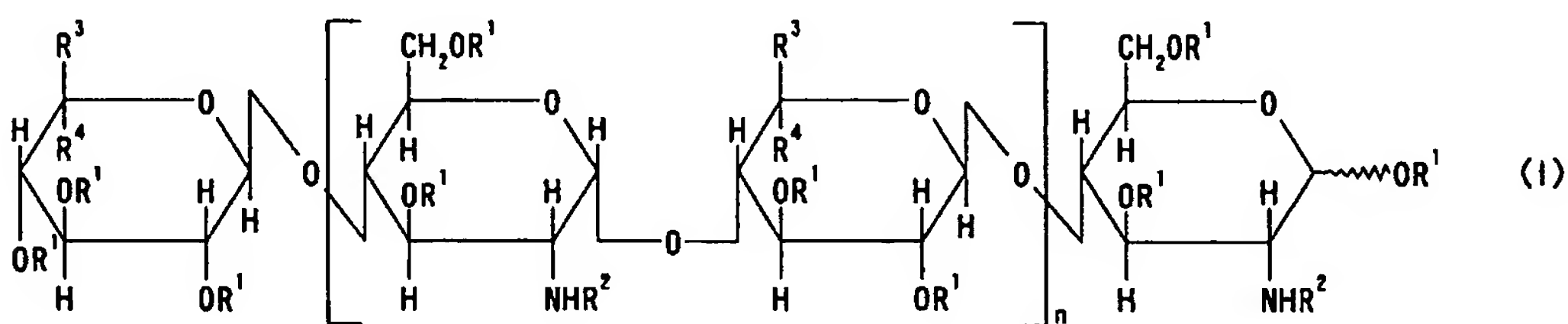
[19] ウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシ

- ド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する糖鎖化合物(但し、糖鎖化合物中、少なくとも1つのグルコサミン残基の6位のヒドロキシル基が硫酸化されている。)又はその塩の有効量を、哺乳動物に投与することを特徴とするHGF産生促進方法。
- [20] ウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する糖鎖化合物(但し、糖鎖化合物中、少なくとも1つのグルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化されている。)又はその塩の有効量を、哺乳動物に投与することを特徴とするHGF産生促進方法。
- [21] ウロン酸残基と、6位のヒドロキシル基又は2位のアミノ基が硫酸化されているグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合又は β 1, 4-グリコシド結合してなる2糖化合物又はその塩の有効量を、哺乳動物に投与することを特徴とするHGF産生促進方法。
- [22] 糖鎖化合物又はその塩が、抗血液凝固作用及びリポプロテインリパーゼ放出作用を有さないか、それらの作用が抑制されていることを特徴とする請求の範囲第12～21項のいずれかに記載のHGF産生促進方法。
- [23] HGF産生促進医薬を製造するための、ウロン酸残基(ウロン酸は、イズロン酸又はグルクロン酸を示す。以下、ウロン酸において同じ。)とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合もしくは β 1, 4-グリコシド結合してなる2糖、又はウロン酸残基とグルコサミン残基とが α 1, 4-グリコシド結合もしくは β 1, 4-グリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する3乃至16糖のオリゴ糖又はその塩であって、ウロン酸残基及びグルコサミン残基の少なくとも1つのヒドロキシル基が硫酸化、アルキル化、アシル化又はアミノ化されていてもよく、少なくとも1つのグルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化、アルキル化又はアシル化されていてもよいオリゴ糖又はその塩の使用。
- [24] 少なくとも1つのウロン酸残基の2位及び／又は少なくとも1つのグルコサミン残基の3位及び／又は6位のヒドロキシル基が硫酸化されていてもよいことを特徴とする請求の範囲第23項に記載の使用。
- [25] 少なくとも1つのグルコサミン残基において、6位のヒドロキシル基及び／又は2位のアミノ基が硫酸化されていることを特徴とする請求の範囲第23項に記載の使用。

- [26] 2乃至10糖からなるオリゴ糖であることを特徴とする請求の範囲第23項に記載の使用。
- [27] オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸のヘパリナーゼ又はヘパリチナーゼ分解物であることを特徴とする請求の範囲第23項に記載の使用。
- [28] オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸の亜硝酸分解法、過酸化水素分解法又は β 脱離のいずれかによる分解物であることを特徴とする請求の範囲第23項に記載の使用。
- [29] オリゴ糖が、次の(a)～(h)で表される化合物のいずれかであることを特徴とする請求の範囲第23項に記載の使用；

(a) 式(I)

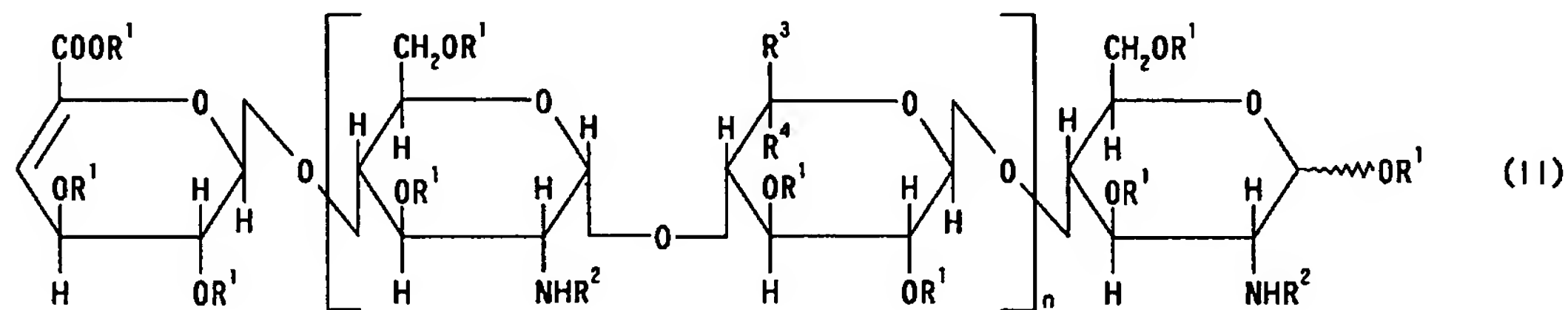
[化1]



(式中、 R^1 は、水素、硫酸基、アルキル基、アシル基又は置換基を有していてもよいアミノ基を示し、 R^2 は、水素、硫酸基、アルキル基又はアシル基を示し、 R^3 及び R^4 は異なって、水素又は置換基を有していてもよいカルボキシル基を示し、 n は0～7を示す。);

(b) 式(II)

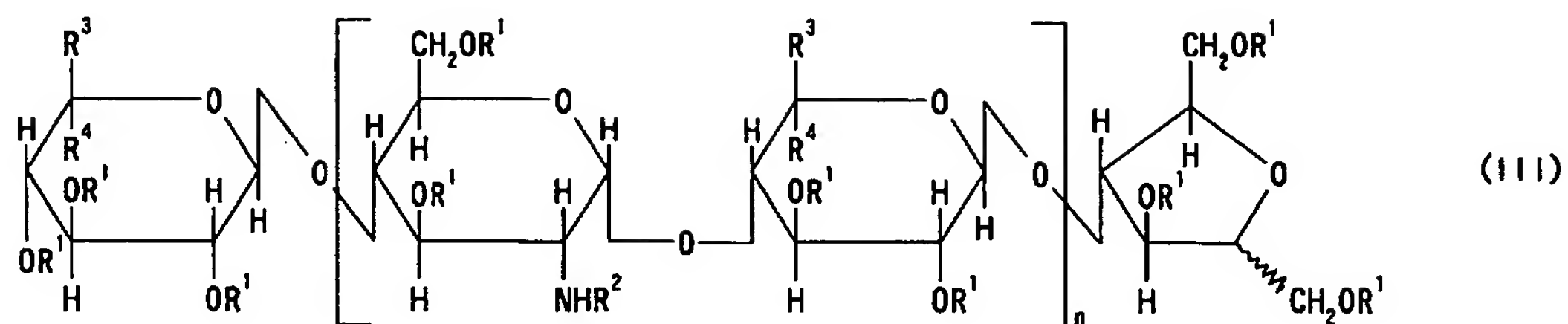
[化2]



(式中、各記号は上記と同じである。);

(c) 式(III)

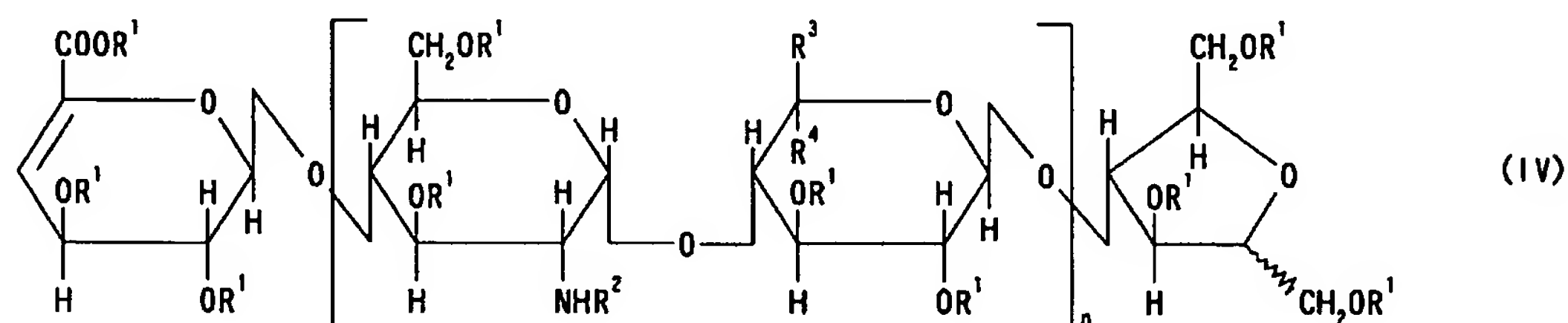
[化3]



(式中、各記号は上記と同じである。);

(d) 式(IV)

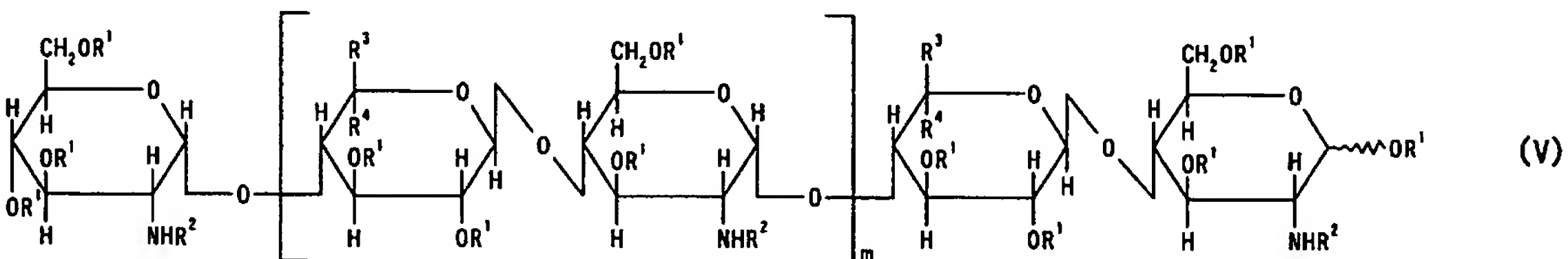
[化4]



(式中、各記号は上記と同じである。);

(e) 式(V)

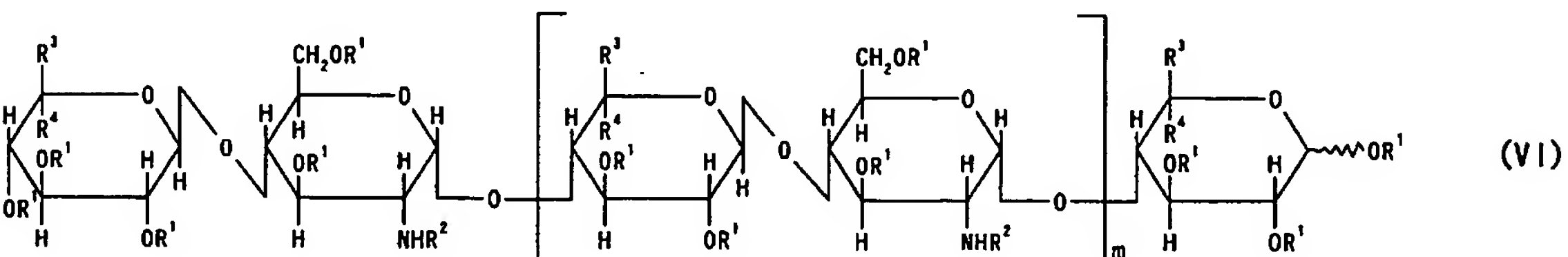
[化5]



(式中、mは0~6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。);

(f) 式(VI)

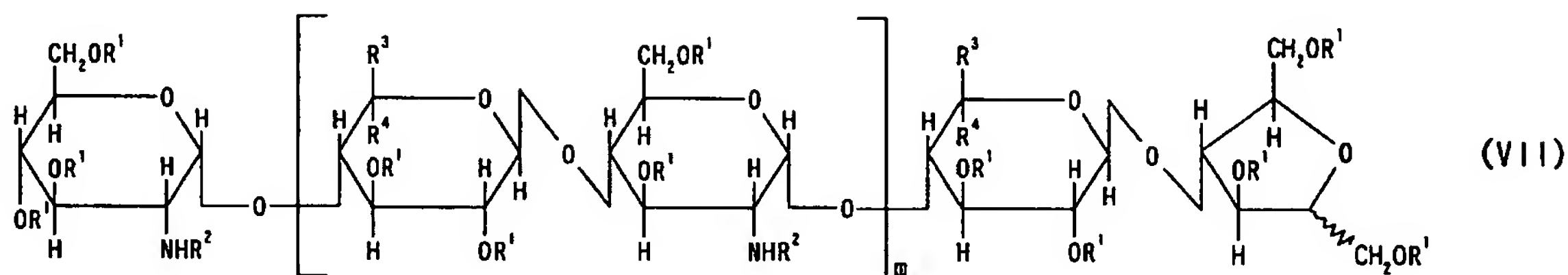
[化6]



(式中、 m は0～6を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は上記と同じである。);

(g) 式(VII)

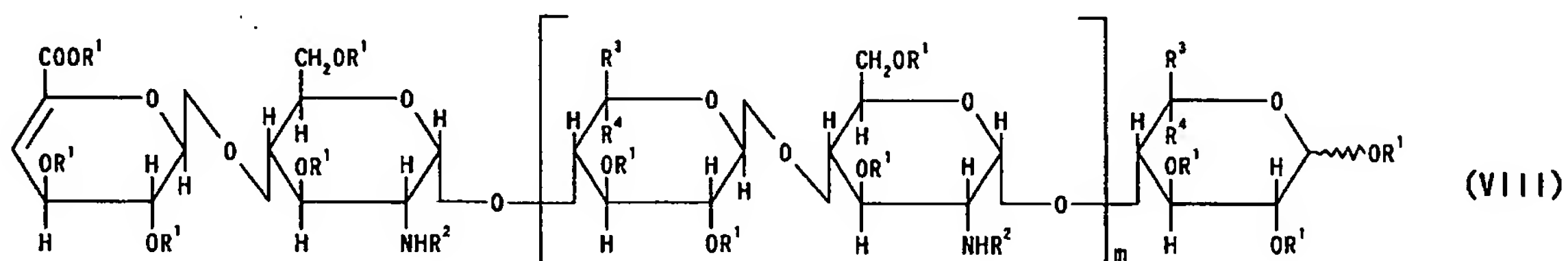
[化7]



(式中、 m は0～6を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は上記と同じである。);又は

(h) 式(VIII)

[化8]



(式中、 m は0～6を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は上記と同じである。);

[30] HGF産生促進医薬を製造するための、ウロン酸残基とグルコサミン残基とが $\alpha 1, 4$ ーグリコシド結合又は $\beta 1, 4$ ーグリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する糖鎖化合物(但し、糖鎖化合物中、少なくとも1つのグルコサミン残基の6位のヒドロキシル基が硫酸化されている。)又はその塩の使用。

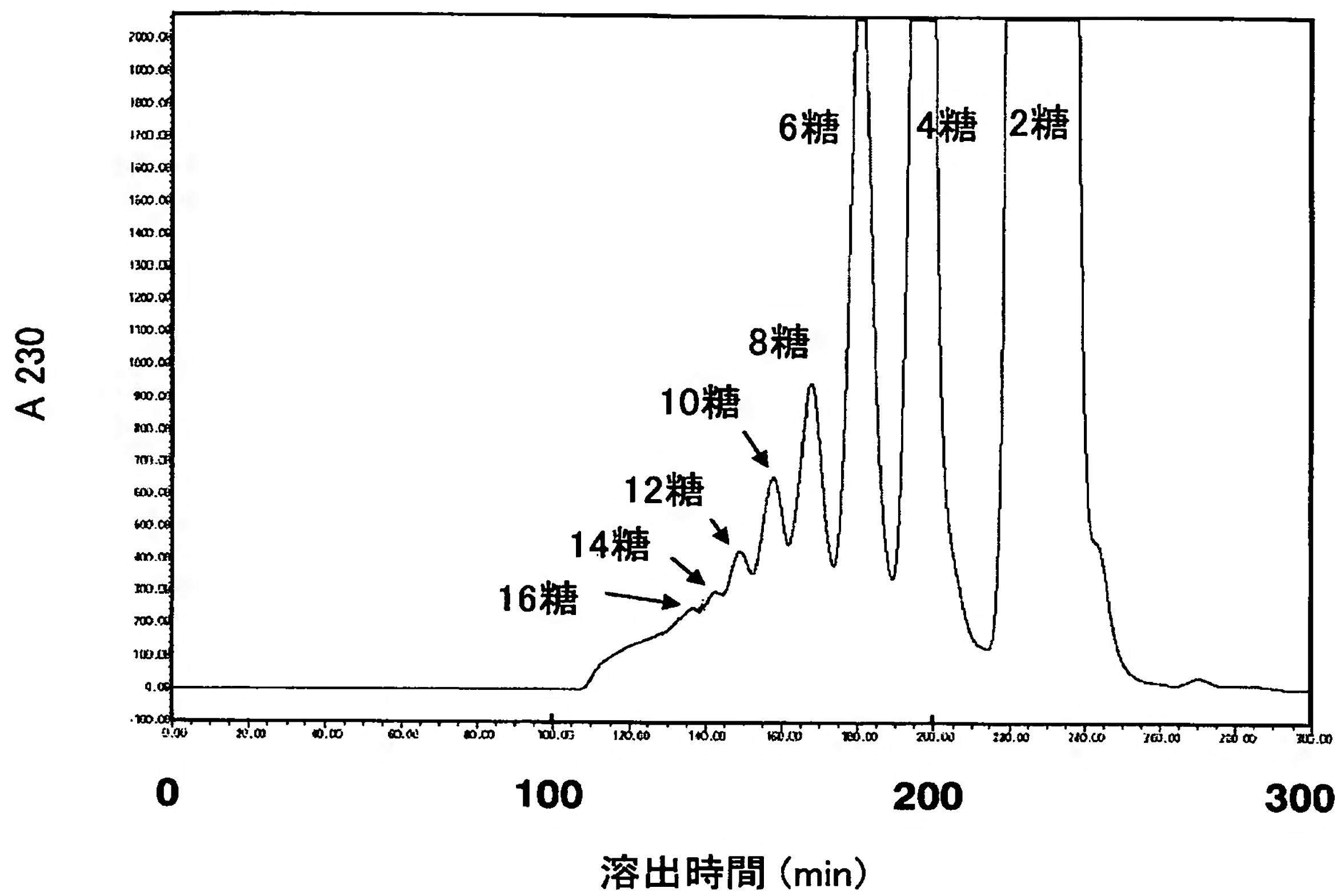
[31] HGF産生促進医薬を製造するための、ウロン酸残基とグルコサミン残基とが $\alpha 1, 4$ ーグリコシド結合又は $\beta 1, 4$ ーグリコシド結合によって交互に繰返し結合した構造を有する糖鎖化合物(但し、糖鎖化合物中、少なくとも1つのグルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化されている。)又はその塩の使用。

[32] HGF産生促進医薬を製造するための、ウロン酸残基と、6位のヒドロキシル基又は2位のアミノ基が硫酸化されているグルコサミン残基とが $\alpha 1, 4$ ーグリコシド結合又は $\beta 1, 4$ ーグリコシド結合してなる2糖化合物又はその塩の使用。

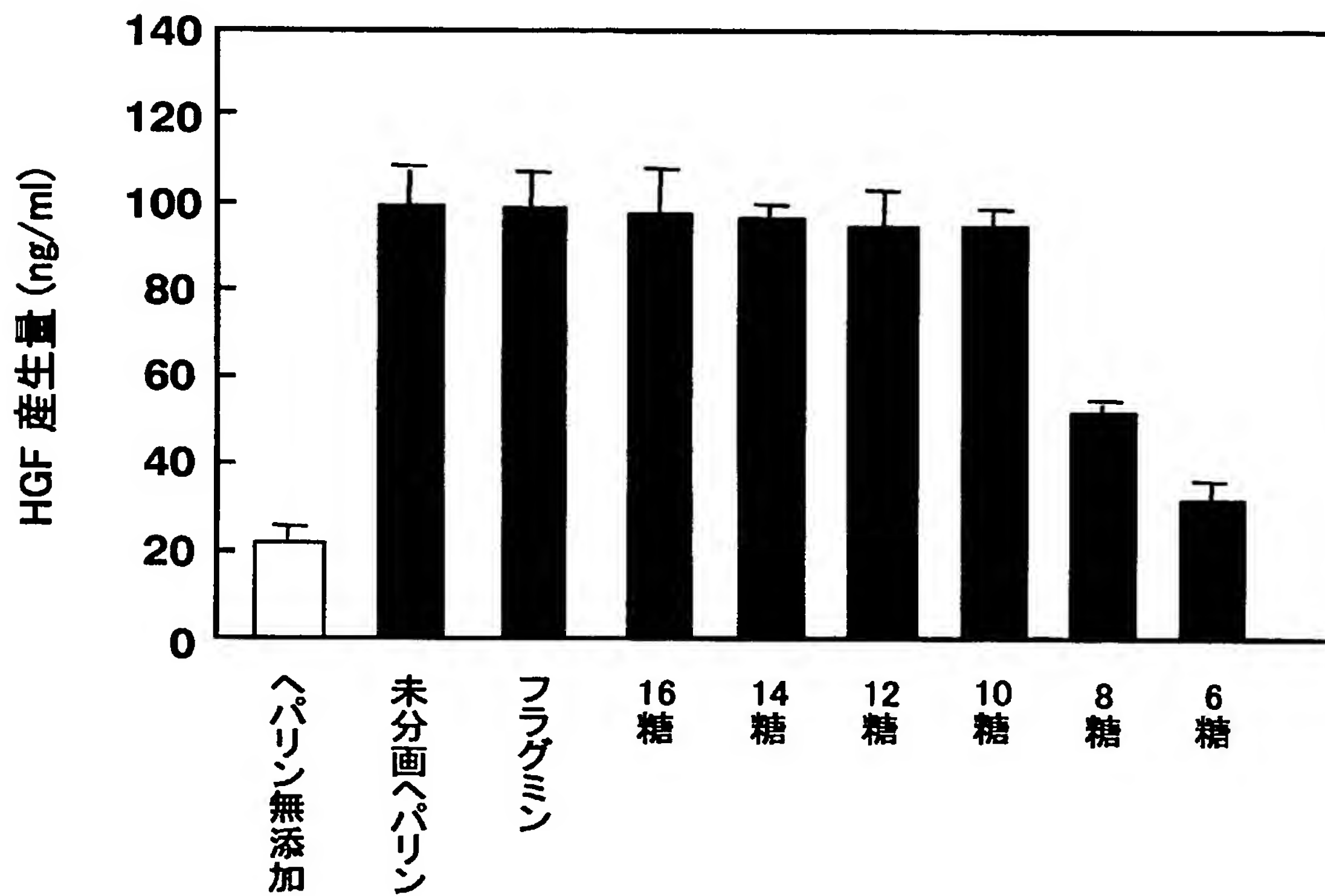
[33] 糖鎖化合物又はその塩が、抗血液凝固作用及びリポプロテインリパーゼ放出作用を有さないか、それらの作用が抑制されていることを特徴とする請求の範囲第23～3

2項のいずれかに記載の使用。

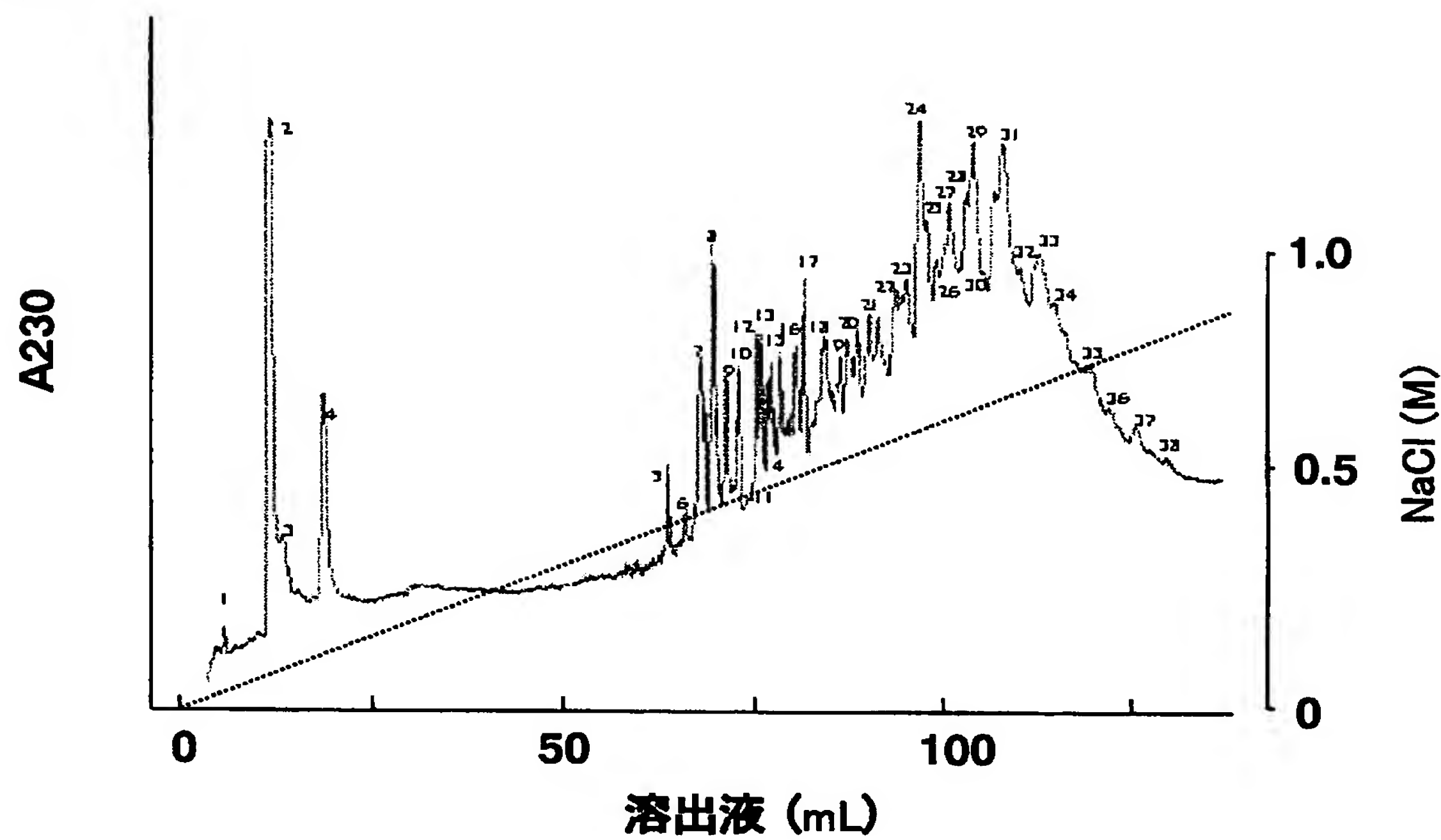
[図1]



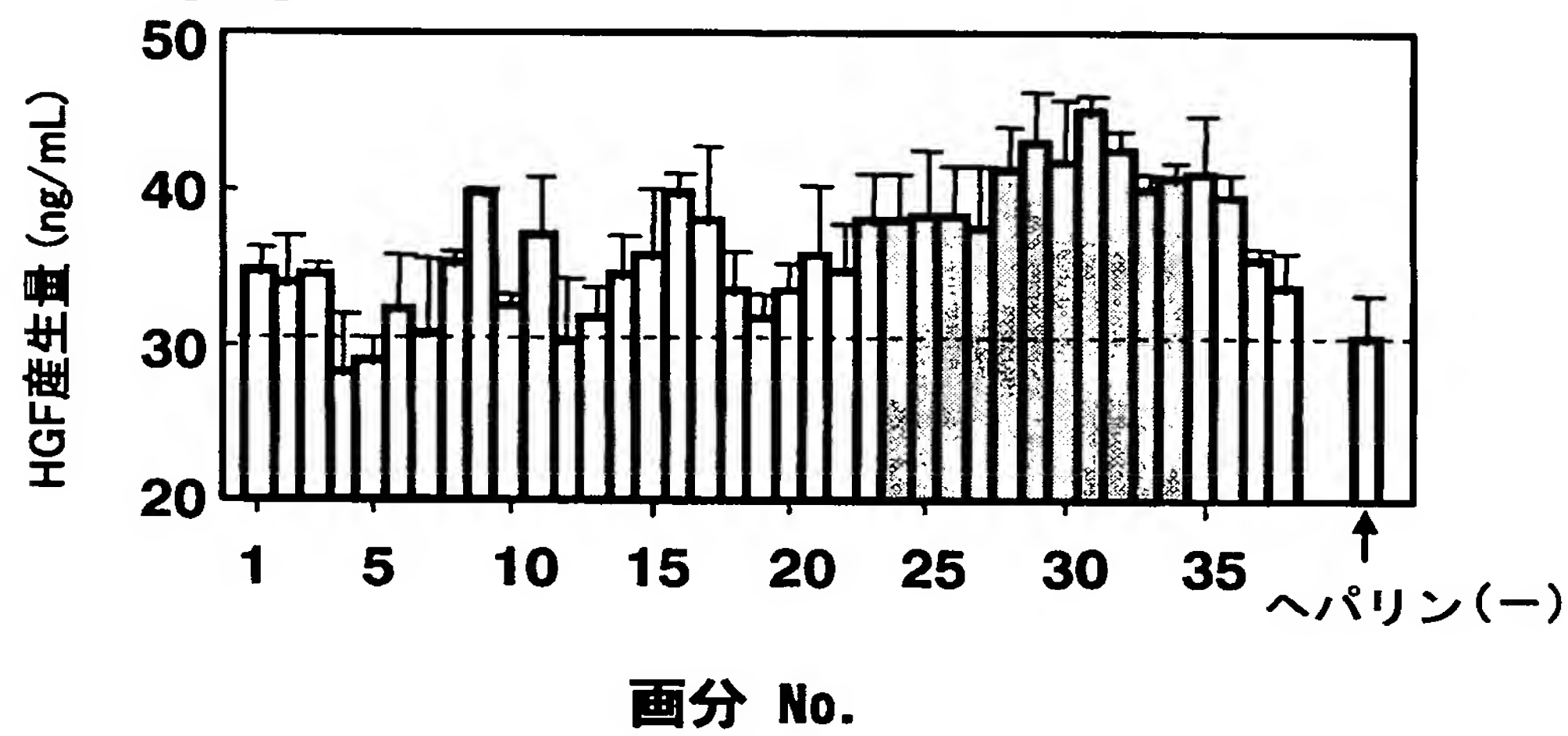
[図2]



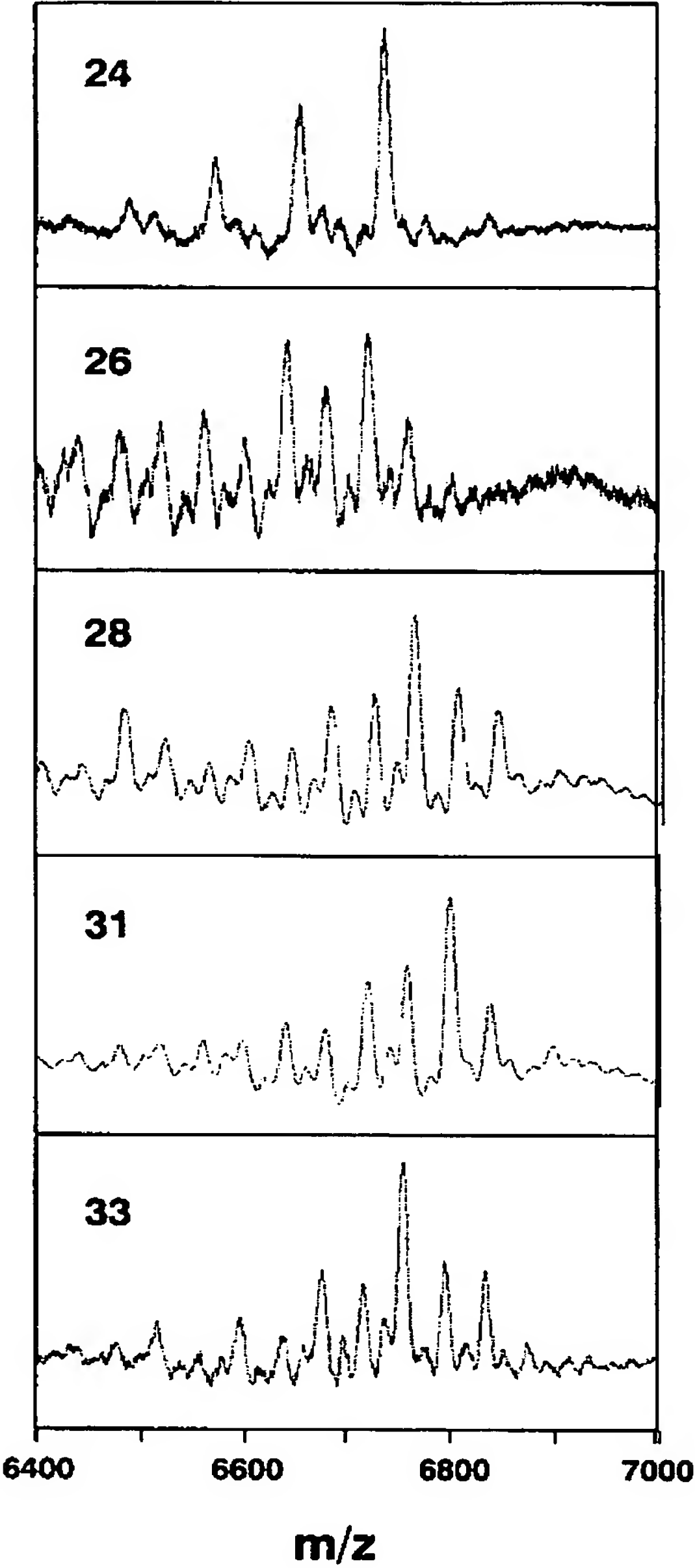
[図3]



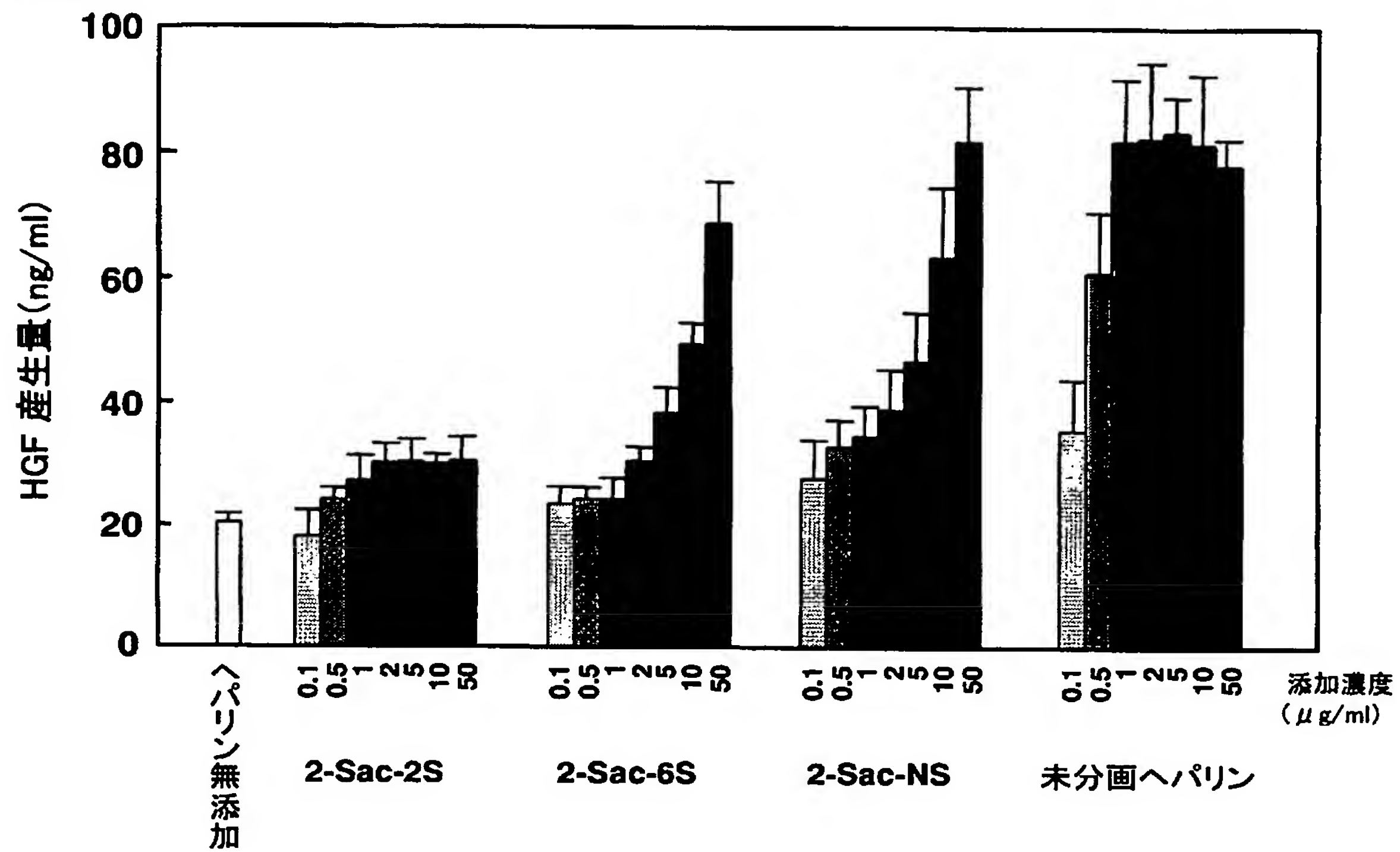
[図4]



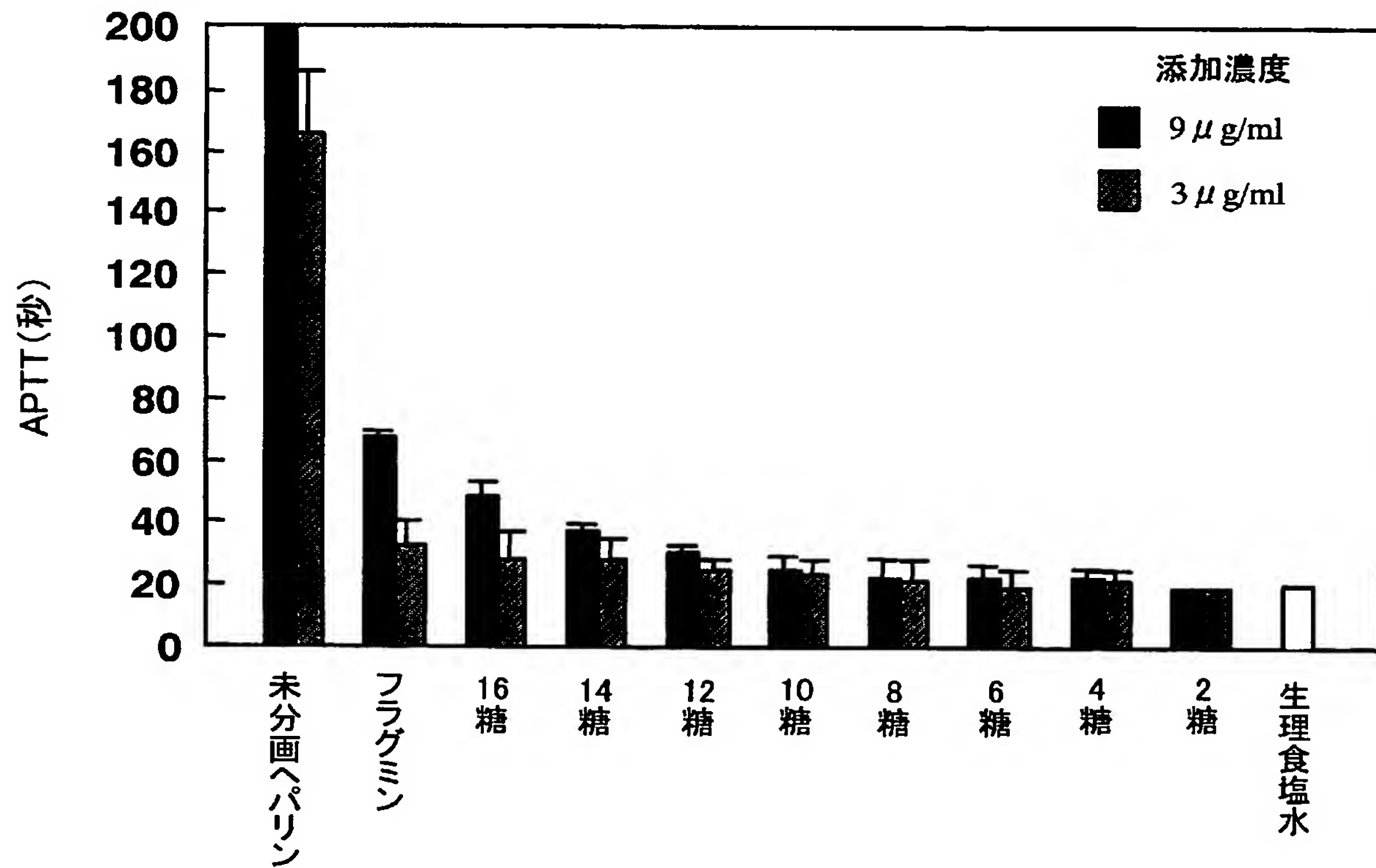
[図5]



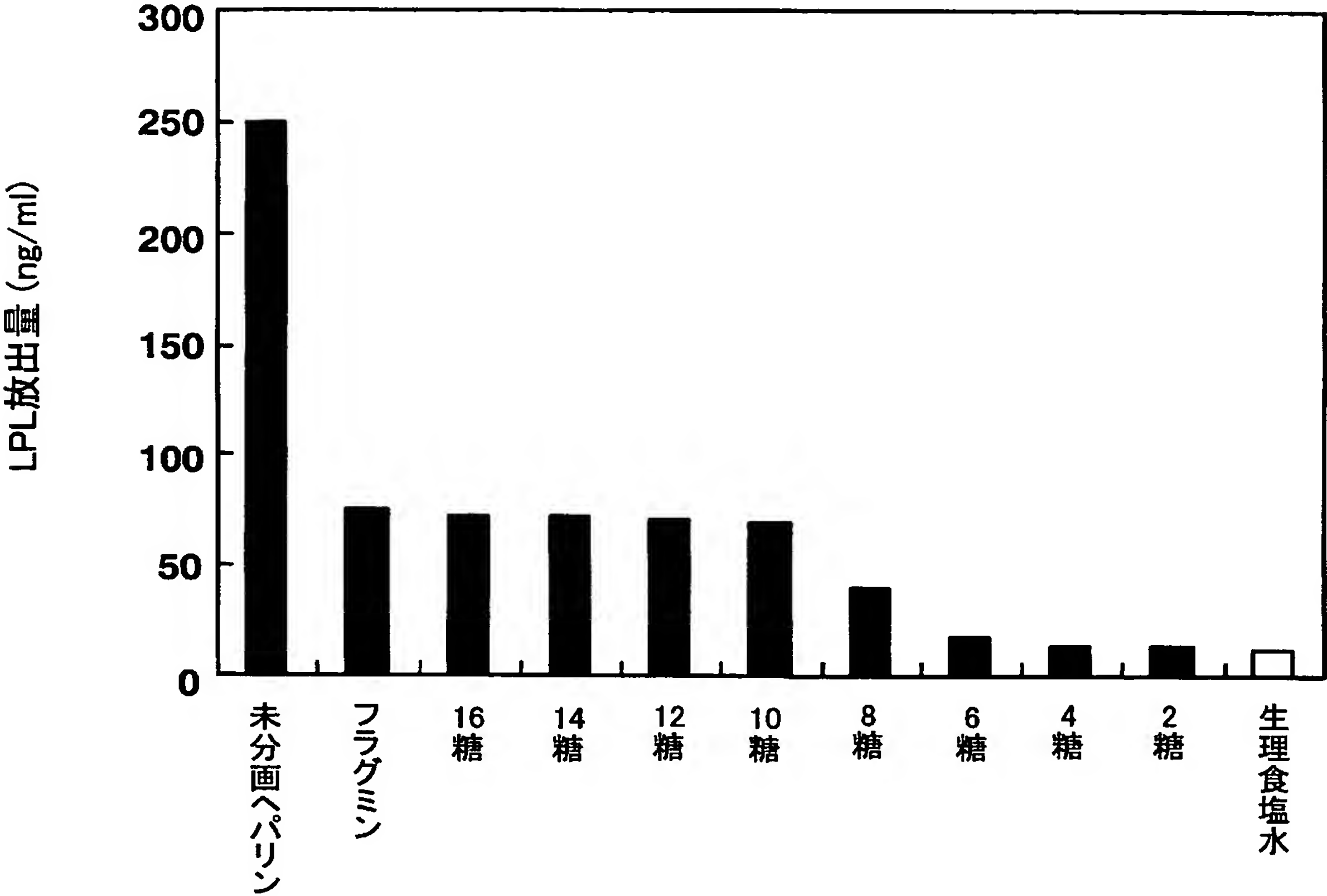
[図6]



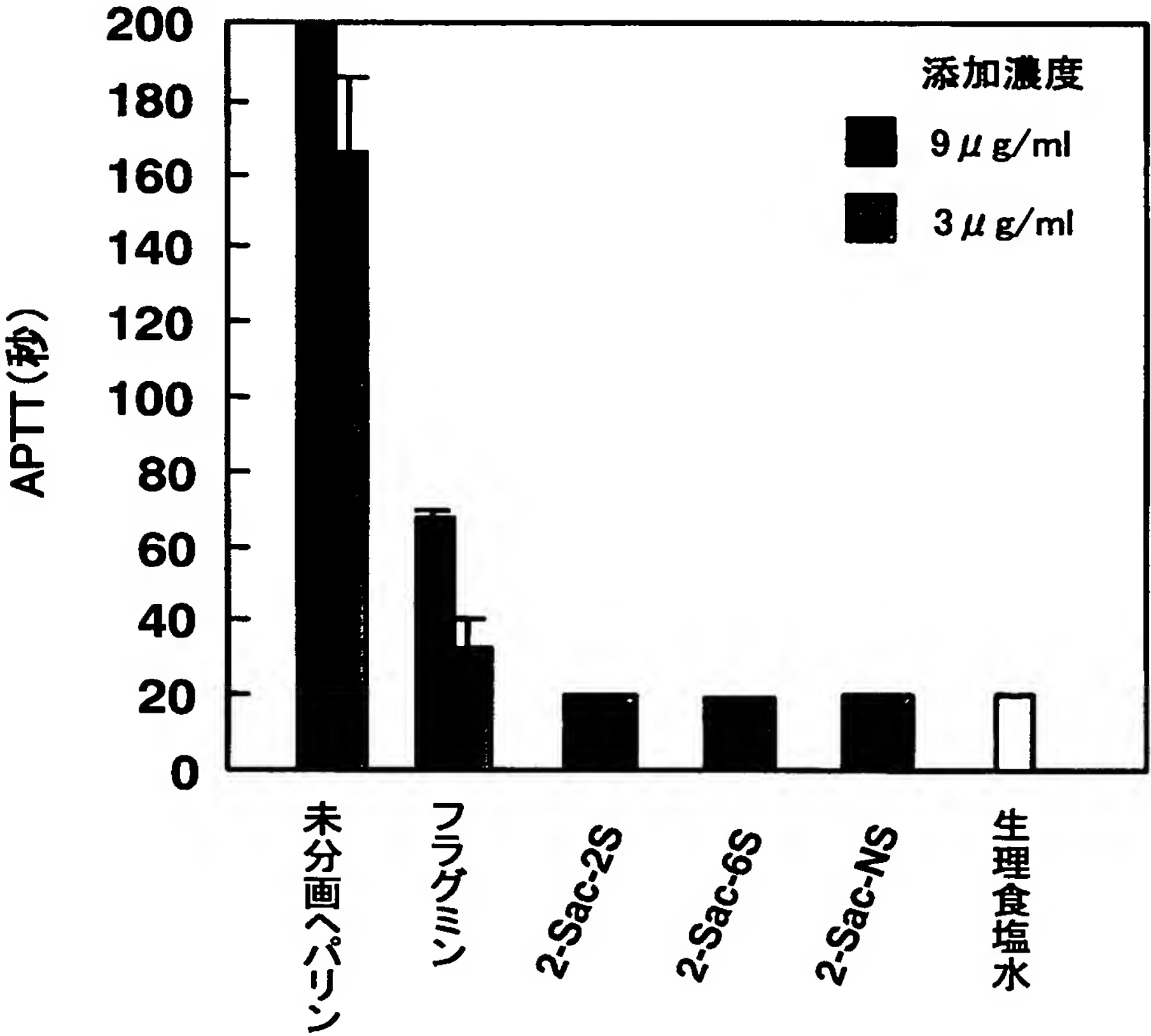
[図7]



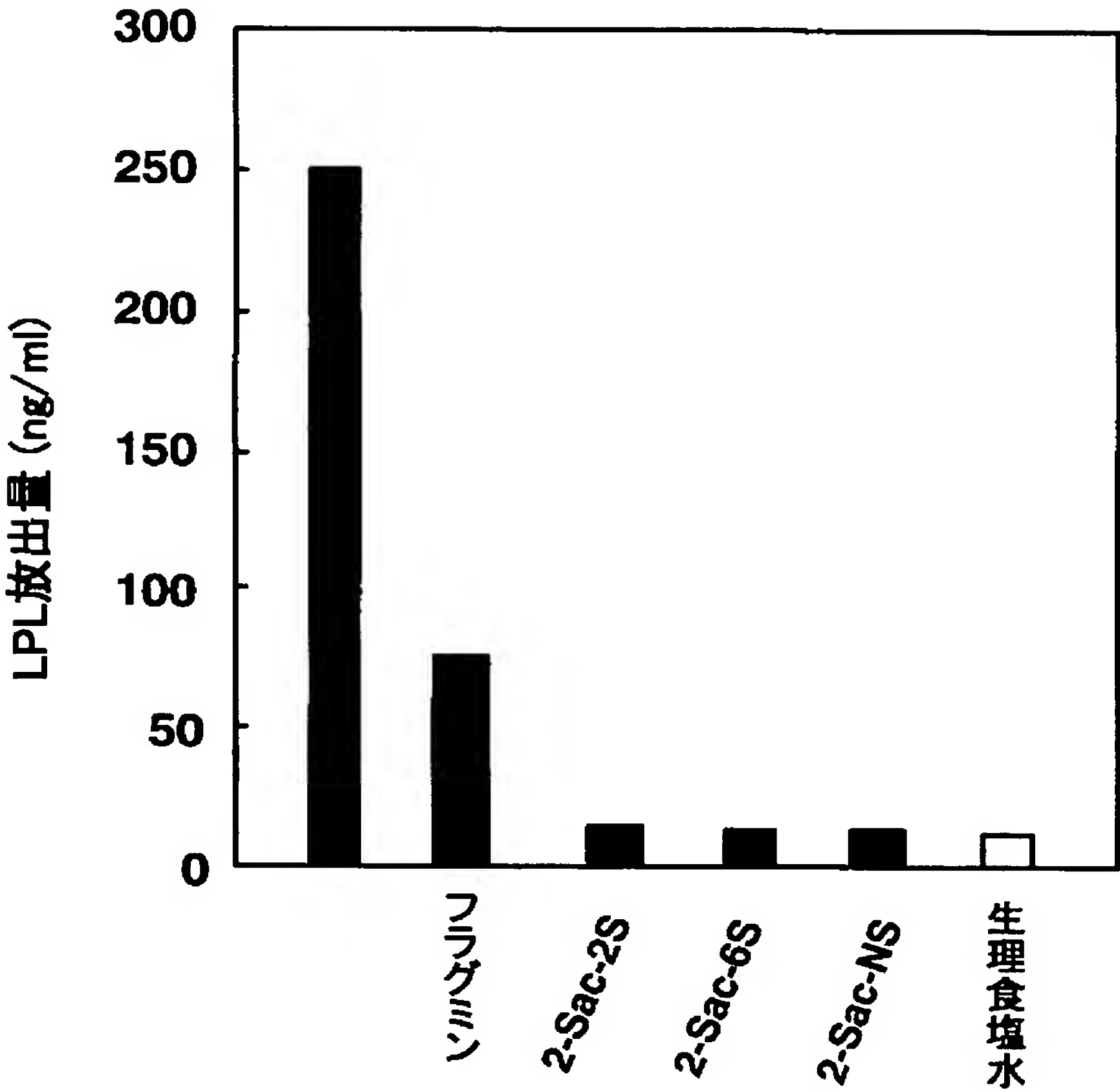
[図8]



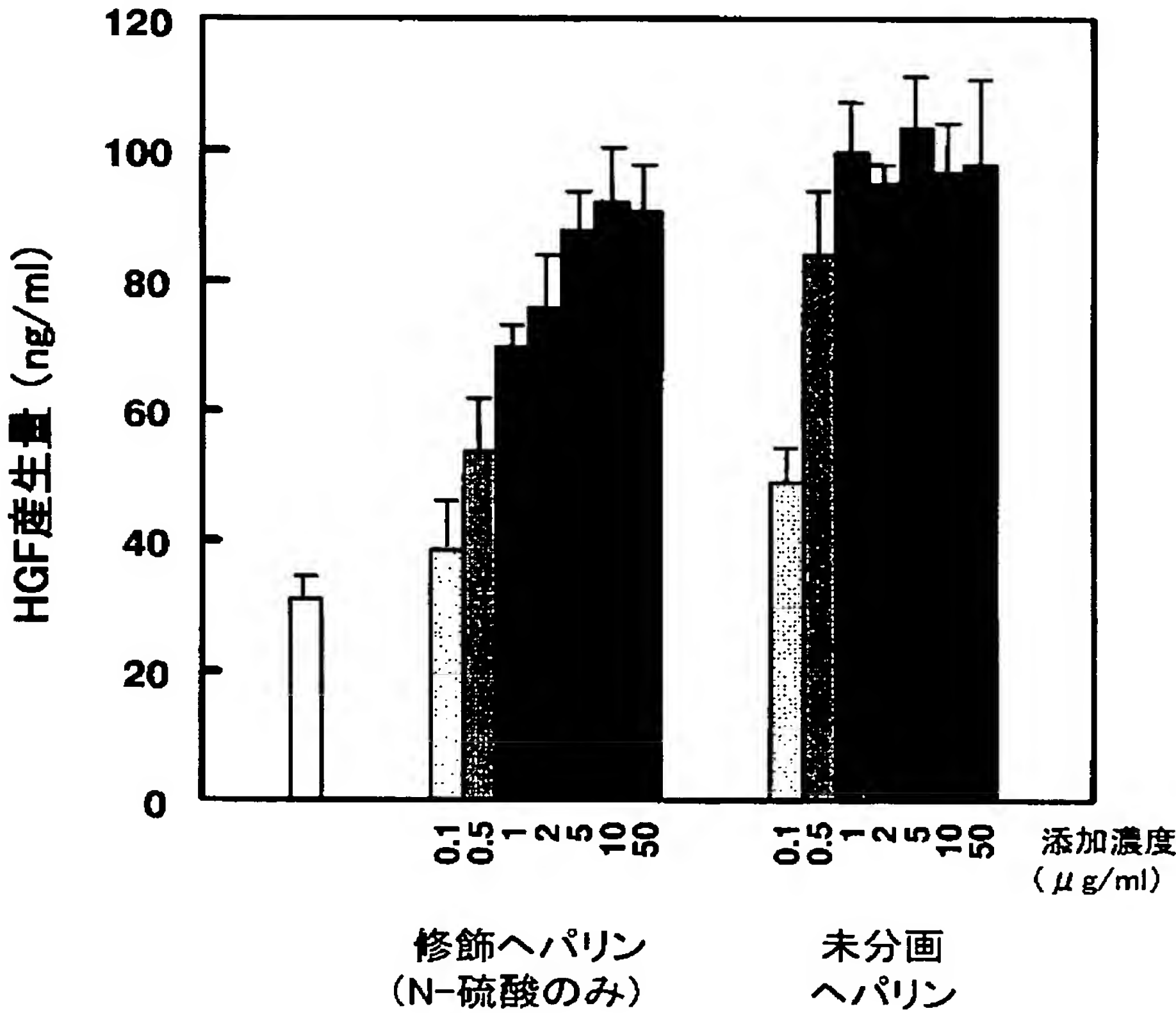
[図9]



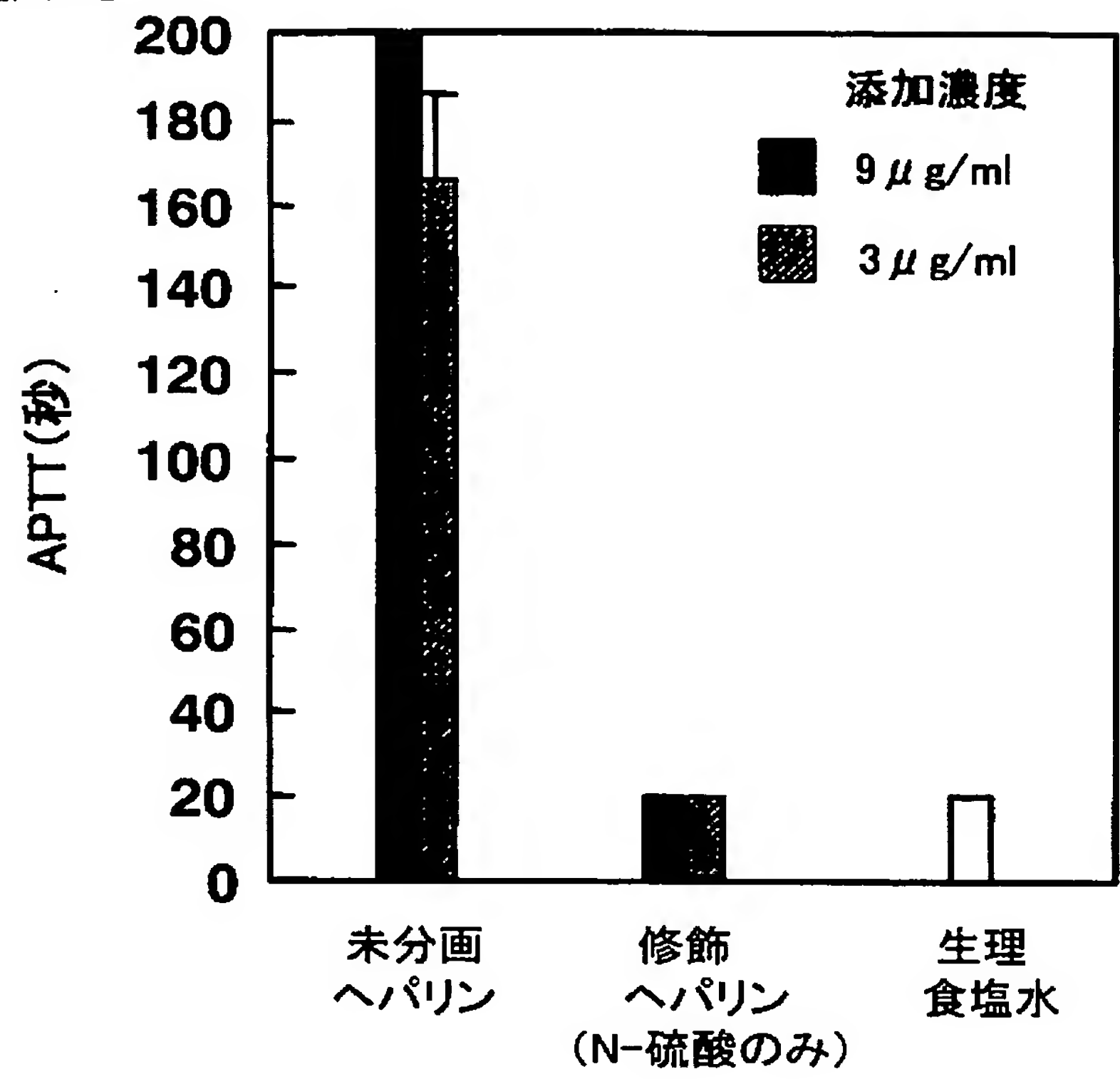
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005741

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K31/715, 31/7016, 31/702, A61P1/04, 1/16, 7/04, 11/00, 13/12,
17/00, 17/02, 19/02, 19/10, 25/00, 27/02, 35/00, 43/00, C07H11/00,
C08B37/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K31/715, 31/7016, 31/702, A61P1/04, 1/16, 7/04, 11/00, 13/12,
17/00, 17/02, 19/02, 19/10, 25/00, 27/02, 35/00, 43/00, C07H11/00,
C08B37/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2002/083700 A2 (IVAX RESEARCH, INC.), 24 October, 2004 (24.10.04), Full text & JP 2005-510453 A & EP 1381620 A2 & US 2003/87875 A1	7, 11, 29, 33
X	JP 8-506322 A (Yeda Research & Development Co., Ltd.), 09 July, 1996 (09.07.96), Full text & WO 1994/011006 A1 & EP 669827 A1 & US 5861382 A & US 6020323 A	7, 11, 29, 33
X	JP 6-506973 A (GLYCOMED, INC.), 04 August, 1994 (04.08.94), Full text & WO 1992/018546 A1 & EP 582665 A1	1-4, 6-9, 11, 23-26, 28-31, 33

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 June, 2005 (22.06.05)

Date of mailing of the international search report

12 July, 2005 (12.07.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005741

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 4-503950 A (GLYCOMED INC.), 16 July, 1992 (16.07.92), Full text & WO 1990/006755 A1 & EP 448637 A1 & US 5032679 A	1-4, 6-11, 23-26, 28-33
X	JP 63-66192 A (SANOFI), 24 March, 1988 (24.03.88), Full text & EP 244298 A2 & US 5034520 A	1-11, 23-33
A	WO 2003/022291 A1 (SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A), 20 March, 2003 (20.03.03), Claim 9 & JP 2005-506326 A & EP 1427427 A1	1-11, 23-33
A	WO 1999/026984 A1 (Ikuo YAMASHINA), 03 June, 1999 (03.06.99), Claim 2; page 13, line 1 to page 14, line 6 & JP 2000-522139 A & EP 1033375 A1 & US 6569840 B1	1-11, 23-33
A	JP 10-218902 A (Seikagaku Corp.), 18 August, 1998 (18.08.98), Claims 4, 6; Par. No. [0038] (Family: none)	1-11, 23-33
A	JP 8-92104 A (Teijin Ltd.), 09 April, 1996 (09.04.96), Claims 4, 6; Par. Nos. [0003], [0009] to [0017] (Family: none)	1-11, 23-33
A	JP 6-312941 A (Toshikazu NAKAMURA), 08 November, 1994 (08.11.94), Claim 1; column 4, line 46 to column 5, line 4; example 7 (Family: none)	1-11, 23-33
A	JP 6-507635 A (Yeda Research & Development Co., Ltd.), 01 September, 1994 (01.09.94), Claim 2 & WO 1993/004325 A1 & EP 598723 A1 & US 5040373 A	1-11, 23-33
A	JP 2002-3384 A (Seikagaku Corp.), 09 January, 2002 (09.01.02), Full text (Family: none)	1-11, 23-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005741

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-327002 A (Seikagaku Corp.), 15 November, 2002 (15.11.02), Full text (Family: none)	1-11, 23-33
A	JP 8-34801 A (Seikagaku Corp.), 06 February, 1996 (06.02.96), Full text (Family: none)	1-11, 23-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005741

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 12 - 22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in claims 12 to 22 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT (continued to extra sheet)
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005741

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K31/715, 31/7016, 31/702, A61P1/04, 1/16, 7/04, 11/00, 13/12, 17/00, 17/02, 19/02, 19/10, 25/00, 27/02, 35/00, 43/00, C07H11/00, C08B37/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K31/715, 31/7016, 31/702, A61P1/04, 1/16, 7/04, 11/00, 13/12, 17/00, 17/02, 19/02, 19/10, 25/00, 27/02, 35/00, 43/00, C07H11/00, C08B37/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN), REGISTRY(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO.2002/083700 A2 (IVAX RESEARCH, INC.) 2002.10.24, 全文 & JP 2005-510453 A & EP 1381620 A2 & US 2003/87875 A1	7, 11, 29, 33
X	JP 8-506322 A (イエダ リサーチ アンド ディベロップメント カンパニー リミテッド) 1996.07.09, 全文 & WO 1994/011006 A1 & EP 669827 A1 & US 5861382 A & US 6020323 A	7, 11, 29, 33
X	JP 6-506973 A (グライコメッド インコーポレイテッド) 1994.08.04, 全文 & WO 1992/018546 A1 & EP 582665 A1	1-4, 6-9, 11, 23-26, 28-31,

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.06.2005

国際調査報告の発送日

12.7.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

渡辺 仁

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

3544

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
		33
X	JP 4-503950 A (グリコメド インコーポレイテッド) 1992. 07. 16, 全文 & WO 1990/006755 A1 & EP 448637 A1 & US 5032679 A	1-4, 6-11, 23-26, 28-33
X	JP 63-66192 A (サノファイ) 1988. 03. 24, 全文 & EP 244298 A2 & US 5034520 A	1-11, 23-33
A	WO 2003/022291 A1 (SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A) 2003. 03. 20, 請求項 9 & JP 2005-506326 A & EP 1427427 A1	1-11, 23-33
A	WO 1999/026984 A1 (山科郁男) 1999. 06. 03, 請求の範囲 2、第 1 3 頁第 1 行—第 1 4 頁第 6 行 & JP 2000-522139 A & EP 1033375 A1 & US 6569840 B1	1-11, 23-33
A	JP 10-218902 A (生化学工業株式会社) 1998. 08. 18, 請求項 4、6、段落【0038】 (ファミリーなし)	1-11, 23-33
A	JP 8-92104 A (帝人株式会社) 1996. 04. 09, 請求項 4、6、段落【0003】、段落【0009】～【0017】 (ファミリーなし)	1-11, 23-33
A	JP 6-312941 A (中村敏一) 1994. 11. 08, 請求項 1、第 4 欄第 4 6 行—第 5 欄第 4 行、実施例 7 (ファミリーなし)	1-11, 23-33
A	JP 6-507635 A (イエダ リサーチ アンド ディベロップメント カンパニー リミテッド) 1994. 09. 01, 請求項 2 & WO 1993/004325 A1 & EP 598723 A1 & US 5040373 A	1-11, 23-33
A	JP 2002-3384 A (生化学工業株式会社) 2002. 01. 09, 全文 (ファミリーなし)	1-11, 23-33
A	JP 2002-327002 A (生化学工業株式会社) 2002. 11. 15, 全文 (ファミリーなし)	1-11, 23-33
A	JP 8-34801 A (生化学工業株式会社) 1996. 02. 06, 全文 (ファミリーなし)	1-11, 23-33

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 12-22 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 12-22 は、人の身体の治療による処置方法に係る発明であるから、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

VIII-4-1	<p>発明者である旨の申立て(米国を指定国とする場合) 発明者である旨の申立て(米国を指定国とする場合)(規則4.17(iv)及び51の2.1(a)(iv))</p>	<p>私は、特許請求の範囲に記載され、かつ特許が求められている対象に関して、自らが最初、最先かつ唯一の発明者である(発明者が1名しか記載されていない場合)か、あるいは共同発明者である(複数の発明者が記載されている場合)と信じていることを、ここに申し立てる。</p> <p>本申立ては、本書がその一部をなす国際出願を対象としたものである(出願時に申立てを提出する場合)。</p> <p>私は、特許請求の範囲を含め、上記国際出願を検討し、かつ内容を理解していることを、ここに表明する。</p> <p>私は、PCT規則4.10の規定に従い、上記出願の願書において主張する優先権を特定し、かつ、「先の出願」という見出しの下に、出願番号、国名又は世界貿易機関の加盟国名、出願日、出願月、出願年を記載することで、米国以外の少なくとも一国を指定しているPCT国際出願を含め、優先権を主張する本出願の出願日よりも前の出願日を有する、米国以外の国で出願された特許又は発明証の出願をすべて特定している。</p>
		<p>私は、連邦規則法典第37編規則1.56 (37C.F.R. § 1.56) に定義された特許性に関し重要であると知った情報について開示義務があることを、ここに承認する。さらに、一部継続出願である場合、先の出願の日から一部継続出願のPCT国際出願日までの間に入手可能になった重要な情報について開示義務があることを承認する。</p> <p>私は、表明された私自身の知識に基づく陳述が真実であり、かつ情報と信念に関する陳述が真実であると信じていることをここに申し立てる。さらに、故意に虚偽の陳述などを行った場合は、米国法典第18編第1001条に基づき、罰金、拘禁、又はその両方により処罰され、またそのような故意による虚偽の陳述は、本出願又はそれに対して与えられるいかなる特許についても、その有効性を危うくすることを理解した上で陳述が行われたことを、ここに申し立てる。</p>

PCT

紙面による写し(注意 提出用では有りません)

VIII-4-1 -1-1	氏名(姓名)	中村 敏一
VIII-4-1 -1-2	住所: (都市名、米国の州名(該当する場合)又は 国名)	京都市, 日本国
VIII-4-1 -1-3	郵便のあて名:	日本国 京都府京都市左京区岡崎法勝寺町 1 - 4
VIII-4-1 -1-4	国籍:	JP
VIII-4-1 -1-5	発明者の署名: (国際出願の願書に発明者の署名がない 場合や、規則26の3に基づいて国際出願の 出願後に申立ての補充や追加がなされた 場合。署名は代理人ではなく、発明者のも のでなければならない。)	/NAKAMURA, Toshikazu/
VIII-4-1 -1-6	日付: (国際出願の願書に発明者の署名がない 場合や、規則26の3に基づいて国際出願の 出願後に申立ての補充や追加がなされた 場合。)	2005年 03月 09日 (09.03.2005)
VIII-4-1 -2-1	氏名(姓名)	松本 邦夫
VIII-4-1 -2-2	住所: (都市名、米国の州名(該当する場合)又は 国名)	箕面市, 日本国
VIII-4-1 -2-3	郵便のあて名:	日本国 大阪府箕面市小野原東 6 丁目 2 5 - 2 - 2 0 4
VIII-4-1 -2-4	国籍:	JP
VIII-4-1 -2-5	発明者の署名: (国際出願の願書に発明者の署名がない 場合や、規則26の3に基づいて国際出願の 出願後に申立ての補充や追加がなされた 場合。署名は代理人ではなく、発明者のも のでなければならない。)	/MATSUMOTO, Kunio/
VIII-4-1 -2-6	日付 (国際出願の願書に発明者の署名がない 場合や、規則26の3に基づいて国際出願の 出願後に申立ての補充や追加がなされた 場合。)	2005年 03月 09日 (09.03.2005)
VIII-4-1 -3-1	氏名(姓名)	福田 一弘
VIII-4-1 -3-2	住所: (都市名、米国の州名(該当する場合)又は 国名)	箕面市, 日本国
VIII-4-1 -3-3	郵便のあて名:	日本国 大阪府箕面市小野原東 5 丁目 1 8 - 2 7 Tメゾンロ ベリア 2 0 2 号
VIII-4-1 -3-4	国籍:	JP
VIII-4-1 -3-5	発明者の署名: (国際出願の願書に発明者の署名がない 場合や、規則26の3に基づいて国際出願の 出願後に申立ての補充や追加がなされた 場合。署名は代理人ではなく、発明者のも のでなければならない。)	/FUKUTA, Kazuhiro/
VIII-4-1 -3-6	日付 (国際出願の願書に発明者の署名がない 場合や、規則26の3に基づいて国際出願の 出願後に申立ての補充や追加がなされた 場合。)	2005年 03月 09日 (09.03.2005)